

# **Femtosekunden-zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie von solvatochromen Sonden: Eine Suche nach lokaler Wasserdynamik**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Humboldt-Universität zu Berlin

von  
**Dipl.-Chem. Mario Gerecke**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät:  
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Nikolaus P. Ernsting
2. Prof. Klaus Rademann
3. Prof. Karsten Heyne

**Tag der mündlichen Prüfung:** 18. Oktober 2017



Für Dani.





# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zielstellung und Stand der Forschung</b>	<b>1</b>
1.1 Einleitung . . . . .	1
1.2 Solvatationsdynamik . . . . .	3
1.3 zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	9
<b>2 Breitbandige Fluoreszenz-Aufkonversionsspektroskopie</b>	<b>15</b>
2.1 Experimenteller Aufbau . . . . .	15
2.2 Datenverarbeitung . . . . .	20
2.3 Photometrische Korrektur . . . . .	22
2.4 Beispiele . . . . .	37
<b>3 Wasser Solvatationsdynamik um komplexe Matrices</b>	<b>47</b>
3.1 Nukleinsäuren . . . . .	47
3.2 Phospholipide . . . . .	66
3.3 Peptid . . . . .	81
3.4 Hydrophobe Gruppen . . . . .	97
<b>4 Zusammenfassung</b>	<b>119</b>
<b>Experimentalteil</b>	<b>123</b>
1 Verfahren und Geräte . . . . .	123
2 Gemessene Systeme . . . . .	127
<b>Eigene Publikationen</b>	<b>147</b>

*Inhaltsverzeichnis*

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>149</b>
<b>Danksagung</b>	<b>153</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>155</b>

# 1 Zielstellung und Stand der Forschung

## 1.1 Einleitung

„Das Wasser war die Matrix der Welt“ postulierte Paracelsus bereits im 16. Jahrhundert, er verband dabei mit Matrix eine fruchtbare Lebensquelle.<sup>[1-3]</sup> Dass flüssiges Wasser nicht nur der Ursprung des Lebens, sondern auch ein aktiver Bestandteil des Lebens ist, gilt heute als bekannt.<sup>[4,5]</sup> Die Eigenschaft dynamische, intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden unterscheidet Wasser von anderen Flüssigkeiten und ist ein Grund, warum gerade Wasser die „Matrix der Welt“ ist.<sup>[5,6]</sup> Nicht nur die Dichteanomalien beim Schmelzen und bei 4°C, auch der Mechanismus der Reorientierung einzelner Moleküle in flüssiger Phase ist ein Alleinstellungsmerkmal dieses Stoffs. Laage und Hynes zeigten anhand von klassischen Molekulardynamik (MD)-Simulationen, dass Wassermoleküle neue Wasserstoffbrückenbindungen nicht durch kleinschrittige Brownsche Molekularbewegung, sondern eher durch große Winkelsprünge bilden.<sup>[7-9]</sup> Der Bruch und die Neubildung der Wasserstoffbrückenbindungen findet also konzertiert statt. Da Wasser mit etwa 18 u dabei ein relativ kleines Molekül ist, findet diese Dynamik auf einer sehr kurzen Zeitskala von Femtosekunden bis Picosekunden statt.<sup>[10]</sup>

Befinden sich allerdings gelöste Stoffe in der Nähe des Wassermoleküls, so wird das Wasserstoffbrückenbindungen-Netzwerk gestört und die Reorientierungsdynamik verlangsamt. Abhängig von der Art des hydratisierten Stoffes ist die Dynamik der nahen Wassermoleküle, auch Solvatationsdynamik genannt, fast unverändert oder um Größenordnungen langsamer, als die von Bulk-Wasser. Eine experimentelle Beobachtung der lokalen Was-

serdynamik um verschiedene Matrices (nun im chemischen Sinn), erfordert daher nicht nur gute zeitliche Auflösung und Dynamikumfang der verwendeten Methode, sondern auch eine hohe Empfindlichkeit, um kleinste Störungen aufdecken zu können.

In dieser Arbeit soll die Auflösung der Dynamik von Wassermolekülen nahe Nukleinsäuren, Phospholipiddoppelschichten, Peptiden und aliphatische Gruppen gezeigt werden. Jede dieser Umgebungen ist physiologisch bedeutend und Wasser ist jeweils ein aktiver Bestandteil dieser physiologischen Aktivität. Interessanterweise ist die jeweilige Solvationsdynamik um diese Systeme nicht einheitlich beschrieben in der Literatur, sondern stark diskutiert. An dieser Stelle sei nur auf den hochwertigen Übersichtsartikel Quelle 5 verwiesen – es folgen ausführliche Literaturüberblicke für die einzelnen Systeme in dieser Arbeit.

Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse auf diesem Gebiet sind unter anderem die erwähnten Anforderungen an das entsprechende Experiment. Die Methode der breitbandigen, Femtosekunden-zeitaufgelösten Fluoreszenzaufkonversionsspektroskopie (FLUPS) zeichnet sich durch hervorragende spektrale und temporale Auflösung gegenüber anderen Methoden aus und wurde bereits für hochwertige Messungen der Reorientierungsdynamik von Wassermolekülen herangezogen.<sup>[11–13]</sup> Sie wurde in der vorliegenden Arbeit weiterentwickelt und angewendet, um die zeitaufgelöste Fluoreszenz von solvatochromen Sonden zu messen, welche kovalent an die entsprechenden Matrices gebunden sind. Es ergaben sich beispielsweise überraschend schnelle Solvationsdynamiken im Femtosekundenbereich, welche erstmals aufgelöst werden konnten. Andererseits konnte zum Beispiel für Lipide die Umgebungsdynamik erstmals über fünf Größenordnungen der Zeit hinweg verfolgt werden.

Der Fokus dieser Arbeit liegt dabei auf der präzisen Erfassung der Solvationsdynamik. Molekulare Interpretationen dieser erfolgten durch Vergleiche mit MD-Simulationen der gemessenen Systeme.

## 1.2 Solvationsdynamik

In der Literatur wurde die Dynamik von Wassermolekülen häufig mithilfe der dielektrischen Relaxationsspektroskopie, also der Antwort eines Systems auf ein sich zeitlich änderndes elektrisches Feld, diskutiert. Die Polarisation des dielektrischen Mediums reagiert dabei zeitverzögert auf diese Änderung, wie Ab- oder Anschalten dieses Feldes, da die molekularen Dipole sich neu ausrichten. Die Observable für diesen Prozess ist die komplexe dielektrische Permittivität  $\epsilon(\omega) = \epsilon'(\omega) - i\epsilon''(\omega)$ , wobei  $\epsilon'(\omega)$  die dielektrische Dispersion und der imaginäre Teil  $\epsilon''(\omega)$  das dielektrische Verlustspektrum ist. Werden die Wassermoleküle als kugelförmige Dipole, welche sich in einer Flüssigkeit der Viskosität  $\eta$  drehen angenommen, kann  $\epsilon$  durch eine Summe von Debye-funktionen ausgedrückt werden.

$$\epsilon(\omega) = \sum_{i=1}^n \frac{\delta_i}{1 + i\omega\tau_i} + \epsilon_\infty \quad (1.1)$$

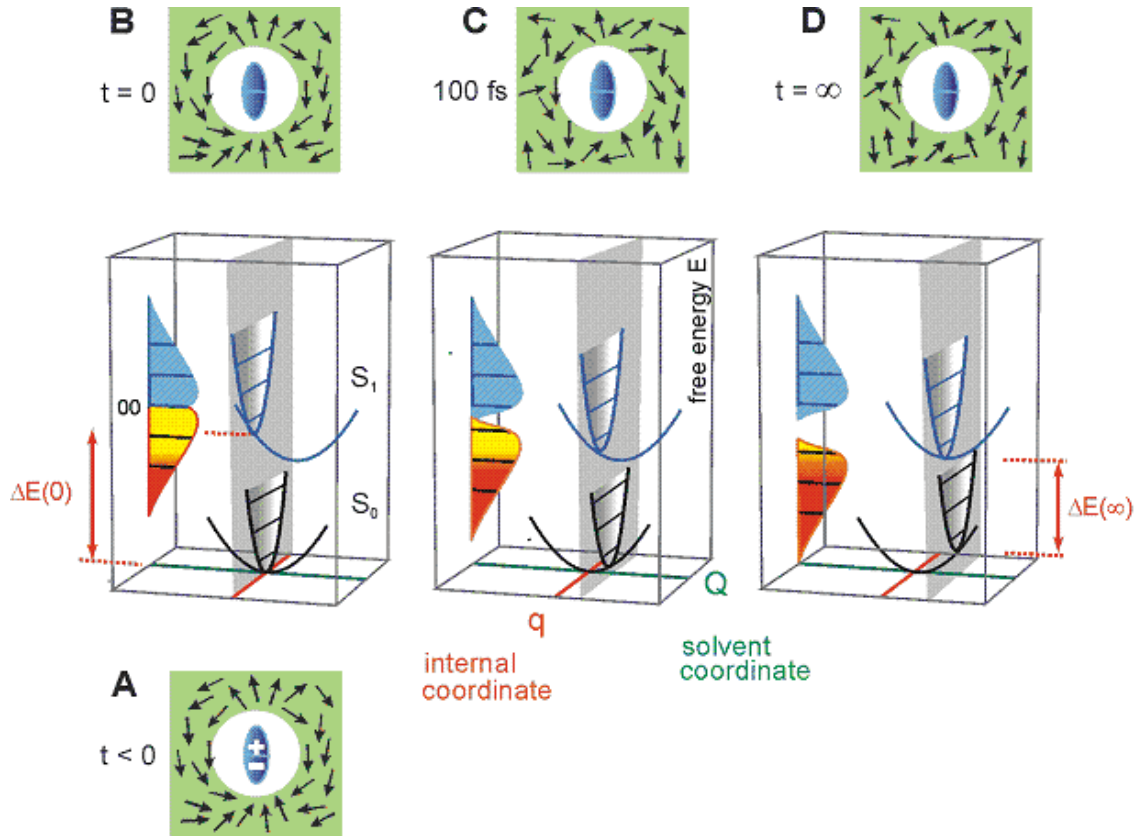
$$\sum_{i=1}^n \delta_i = \epsilon_0 - \epsilon_\infty \quad (1.2)$$

Dabei wird  $\tau_i$  Debyezeit genannt und ist von der  $\eta$ , der Temperatur und dem Molekülradius abhängig. Betrachtet man das spektrale Verhalten von  $\epsilon'$  und  $\epsilon''$  einer Debye-funktion, so beschreibt  $\epsilon'(\omega)$  eine Stufe bei  $\omega = \tau^{-1}$  von  $\epsilon_0$  zu  $\epsilon_\infty$ , während  $\epsilon''$  ein Maximum bei  $\omega = \tau^{-1}$  aufweist.

Im fraglichen Frequenzbereich von 0.1 GHz bis 3 THz werden intermolekulare Moden, wie zum Beispiel kollektive Beugungsmoden von Wasserstoffbrücken zwischen den Wassermolekülen angeregt. Da das gesamte Wasserspektrum nicht mit einer Methode erfasst werden kann, werden dafür die Ergebnisse mehrerer Verfahren zusammengefasst oder nur die Absorption in einem schmalen Frequenzbereich betrachtet.<sup>[14–16]</sup> Während für den Zentimeterwellen-Bereich von 0.2 – 89 GHz kommerziell erhältliche Frequenzbereich-Reflektometer eingesetzt werden können, eignet sich für den Bereich von 0.4 – 1.6 THz gepulste Absorptionsspektroskopie in der Zeitdomäne<sup>[17]</sup> und für 2.1 – 2.8 THz Differenzspektrometer mit einem p-Typ Germaniumlaser als Anregung.<sup>[16]</sup>

Eine andere Möglichkeit die Dynamik und Beweglichkeit von Wassermolekülen zu beobachten ist die Solvensrelaxationstechnik, häufig einfach Bestimmung der Solvatationsdynamik genannt, welche bereits 1964 von Bashiev vorhergesagt wurde.<sup>[18]</sup> Wie bei der dielektrischen Relaxation wird die Antwort der molekularen Dipole auf ein sich änderndes elektrisches Feld untersucht, nur dass hier das Feld um einen ebenfalls molekularen Dipol betrachtet wird. Grundelement ist also eine Polaritätssonde, deren Dipolmoment durch elektronische Anregung geändert werden kann.

In Abbildung 1.1 wird ein Farbstoff in wässriger Umgebung gezeigt, der im Grundzustand (**A**) ein großes Dipolmoment aufweist, welches nach Anregung abgeschaltet wird. Die Wassermoleküle sind dabei, der Kontinuumstheorie folgend,<sup>[19–22]</sup> als Dipolpfeile dargestellt. Im elektronischen Grundzustand  $S_0$  sind die Solvensmoleküle ausgerichtet am elektrischen Feld der Polaritätssonde. Nach dem Frank-Condon-Prinzip läuft die elektronische Anregung auf einer deutlich schnelleren Zeitskala als jegliche Kernbewegungen ab. Daher befinden sich die umgebenden Wassermoleküle direkt nach Abschaltung des Dipolmoments noch im gleichen Zustand wie vor der Anregung (**B**). Die Umgebung der Polaritätssonde beginnt den neuen, ungeladenen Zustand zu relaxieren (**C**). Die Geschwindigkeit dieser Relaxation (auch Solvation genannt) ist abhängig von der Beweglichkeit der umgebenden Moleküle. Während Decanolmoleküle mit einer mittleren Zeit von 245 ps relaxieren,<sup>[19]</sup> beträgt diese Zeit für Bulk-Wassermoleküle weniger als 1 ps.<sup>[10,23]</sup> Die Energie des angeregten Zustands sinkt auf der Solvatationskoordinate, bis ein stationärer Zustand erreicht ist (**D**). Gleichzeitig steigt dabei die Energie des Grundzustands, da die umgebenden Solvensmoleküle nun relaxiert zum ausgeschalteten elektrischen Feld des  $S_1$ -Zustands ausgerichtet sind. Damit wird die Energiedifferenz zwischen  $S_0$ - und  $S_1$ -Zustand zur Observablen, welche durch das Fluoreszenz- oder stimulierte Emissionsspektrum abfragbar ist. Die Spektren verschieben sich mit der Zeit zu kleineren Wellenzahlen beziehungsweise größeren Wellenlängen. Diese Verschiebung wird zeitabhängiger Stokes-Shift (*time-dependent Stokes shift*, TDSS)  $\tilde{\nu}(t)$  genannt.



**Abbildung 1.1:** Solvensrelaxationstechnik beziehungsweise Bestimmung der Solvatationsdynamik. Das Dipolmoment der molekularen Polaritätssonde wird durch elektronische Anregung ausgeschaltet (**A**→**B**). Die Solvensmoleküle relaxieren im neuen elektrischen Feld (**C**), sodass durch Anhebung von  $S_0$  und Absenkung von  $S_1$  ein Stokes-Shift der Emissionsbande auftritt, bis der relaxierte Zustand erreicht ist (**D**).<sup>[21]</sup>

Wenn gewünscht, kann eine Normierung vorgenommen werden. In der Literatur wird dazu üblicherweise Gleichung 1.3 verwendet, die neue Relaxation  $S(t)$  ist normiert auf  $S(t = 0) = 1$  und  $S(t = \infty) = 0$ .<sup>[24]</sup>

$$S(t) = \frac{\tilde{\nu}(t) - \tilde{\nu}(\infty)}{\tilde{\nu}(0) - \tilde{\nu}(\infty)} \quad (1.3)$$

Zum Vergleich von Ergebnissen der Solvationsdynamik aus verschiedenen Arbeiten werden häufig nur die in den Publikationen angegebenen Zeitkonstanten aus exponentiellen Fits des zeitabhängigen Stokes-Shifts  $\tilde{\nu}(t)$ , bzw. der normierten Form  $S(t)$  herangezogen. Es ist allerdings leicht möglich, dass für zwei stark unterschiedliche Dynamiken ähnliche Zeitkonstanten erhalten werden, wenn die entsprechenden Amplituden variieren. In dieser Arbeit soll daher stets auch die mittlere Solvationszeit  $\tau_{solv}$  betrachtet werden, welche sich aus den Zeitkonstanten  $t_i$  und deren Amplituden  $a_i$  berechnet.

$$\tau_{solv} = \int_0^\infty S(t)dt = \frac{\sum a_i t_i}{\sum a_i} \quad (1.4)$$

$\tau_{solv}$  reflektiert also den gesamten Verlauf von  $S(t)$  und eignet sich damit zum direkten, qualitativen Vergleich der Solvationsdynamik aus unterschiedlichen Quellen.

Als Polaritätssonde bietet sich für Untersuchungen in Wasser der Reichardt-artige<sup>[25]</sup> Chromophor 6-Oxychinolinium Betain Q an, da dieser klein, ungeladen und starr ist bei einer sehr großen Änderung des Dipolmoments nach Anregung.<sup>[13,21–23,26–30]</sup> In mehreren theoretischen Arbeiten wurde gezeigt, dass jegliche intramolekulare Relaxation des Farbstoffs 300 fs nach Anregung abgeschlossen ist,<sup>[27,28]</sup> sodass jegliche darüber hinaus beobachtete Dynamik zweifellos der Umgebungsdynamik des Chromophors zugeordnet werden kann.

Die Bestimmung der Solvationsdynamik ist nicht nur äquivalent zur dielektrischen Relaxation, sondern besitzt darüber hinaus den Vorteil lokal am gewünschten Ort die Dynamik der polaren Umgebung zu messen, ohne störendes Bulkwasser ebenfalls zu erfassen. Falls erforderlich, kann das lokale dielektrische Spektrum ebenfalls aus der beobachteten Relaxation berechnet werden. Dafür wird die Kontinuumstheorie herangezogen.<sup>[19–22]</sup> Die mikroskopische Umgebung der einzelnen Wassermoleküle wird dabei zur mittleren Polarisation zusammengefasst (als Pfeile in Abbildungen 1.1 und 1.2 dargestellt). In Abbildung 1.2 rechts ist die dielektrische Relaxation durch Abschalten eines Plattenkondensators

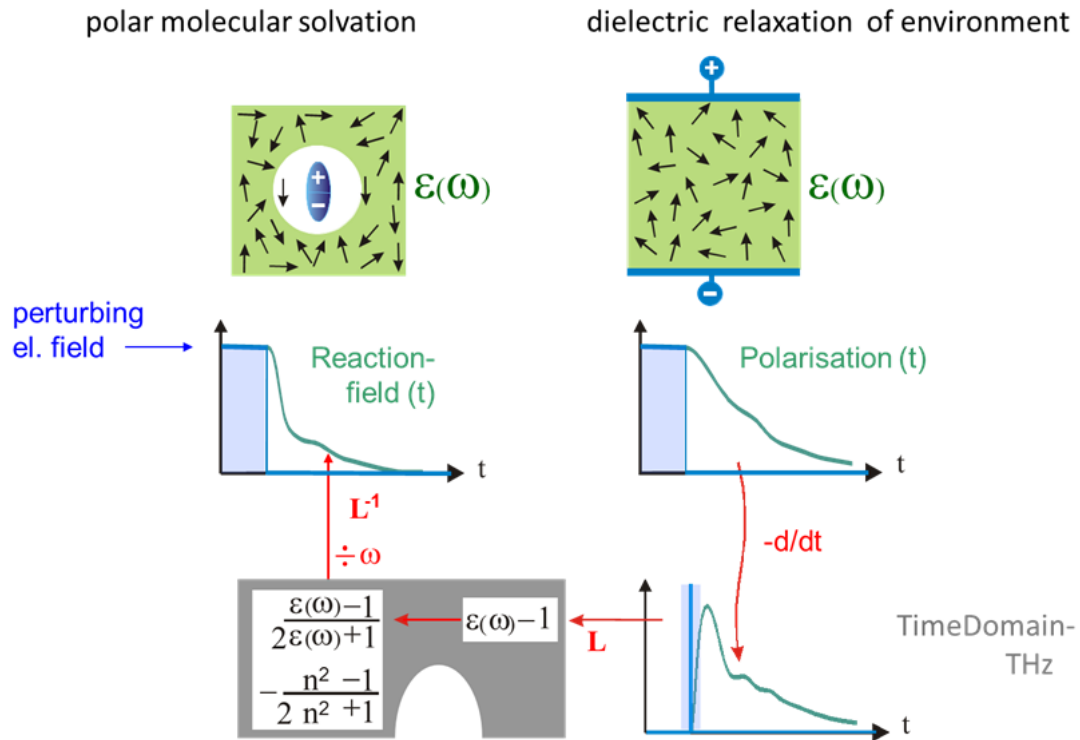


dargestellt. Alternativ kann die Antwort (*response*) auf einen sehr kurzen Puls im fraglichen Frequenzbereich gemessen werden. Ist dieser infinitesimal kurz, so ist die Responsefunktion gleich der zeitlichen Ableitung der Relaxation. Eine Laplace-Transformation, beziehungsweise Fourier-Transformation führt in die Frequenzdomäne, wo  $\epsilon(\omega)$  wie bereits beschrieben, gut durch Debyefunktionen (Gleichung 1.1) beschrieben wird.

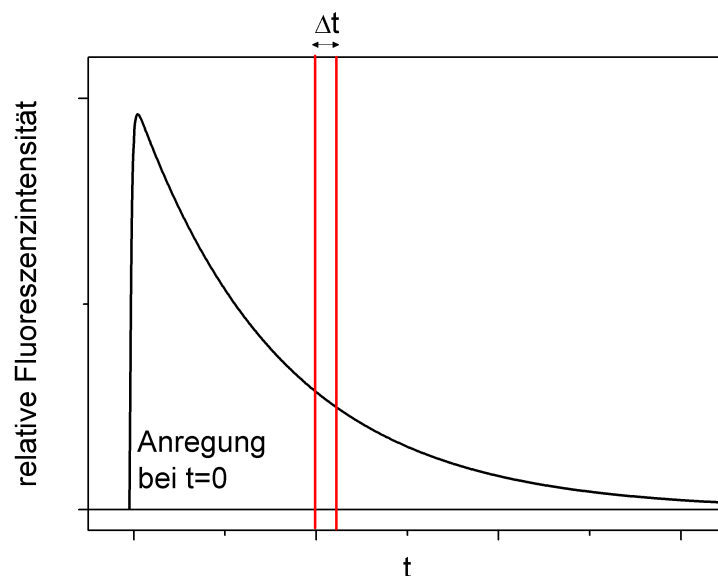
Der Unterschied zur Solvensrelaxationstechnik (Abbildung 1.2 links oben) ist nur durch die Geometrieänderung des elektrischen Felds gegeben. Für den Fall der Relaxation um den Farbstoff kann die dielektrische Suszeptibilität  $\chi = 1 - \epsilon$  für ein Punktdipol in einem sphärischen Reaktionsfeld mithilfe des Funktional  $G(\omega)$  herangezogen werden.<sup>[21,31,32]</sup>

$$G(\omega) = \frac{\epsilon(\omega) - 1}{2\epsilon(\omega) + n_{cav}^2} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + n_{cav}^2} \quad (1.5)$$

Die zeitliche Integration in der Zeitebene ist äquivalent zu einer Division durch die Frequenz im Laplaceraum. Eine anschließende inverse Laplacetransformation führt zur gemessenen Relaxationsfunktion der zeitabhängigen Stokes-Verschiebung. Zur Berechnung von lokalen dielektrischen Spektren  $\epsilon(\omega)$  aus  $S(t)$  oder  $\tilde{\nu}(t)$  kann  $\epsilon$  also durch Debyefunktionen modelliert werden und mithilfe deren Parameter kann eine Fitfunktion  $R(t)$  gebildet werden, welche an die gemessene Relaxation angepasst wird. Dazu wird das modellierte  $\epsilon$  in  $G(\epsilon(\omega))/\omega$  eingesetzt und die entsprechende inverse Laplace-Transformation verwendet.<sup>[13,22]</sup>



**Abbildung 1.2:** Äquivalenz der dielektrischen Relaxation (rechts oben) und der Solvensrelaxationstechnik (links oben). Beide Techniken betrachten die Antwort eines Dielektrikums auf ein sich zeitlich änderndes Feld, unterschiedlich ist nur die Geometrie. Eine Brücke zwischen den Techniken bildet das Funktional  $G$  (Gleichung 1.5) im Frequenzraum (links unten). Über die rot dargestellten Pfeile ist es möglich, eine Fitfunktion für  $S(t)$  zu finden, welche nur Parameter aus der dielektrischen Relaxation beinhaltet. Somit kann das lokale dielektrische Spektrum  $\epsilon(\omega)$  berechnet werden.<sup>[22]</sup>



**Abbildung 1.3:** Veranschaulichung der Abfrage (*gating*) von fs-zeitaufgelöster Fluoreszenz. In schwarz ist der Abfall der gesamten Fluoreszenzintensität gezeigt. Das Abfragefenster mit der Breite bzw. Zeitauflösung  $\Delta t$  wird über den gesamten Zeitraum gefahren um zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren zu erhalten.

### 1.3 zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, bietet sich das Verfolgen des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzbande als Observable für Solvatationsstudien an. Es gibt eine Vielzahl an Methoden, um die zeitaufgelöste Fluoreszenz zu erhalten.<sup>[33,34]</sup> Bei allen wird der Chromophor zu Beginn durch einen möglichst kurzen Laserpuls angeregt. Bisher bekannte Detektoren sind zu langsam, um auf einer Zeitskala von Femto- bis Nanosekunden die folgende Emission des Chromophors aufzulösen. Daher müssen Methoden verwendet werden, welche die Fluoreszenz zu einer bestimmten Zeit nach Anregung aus dem Gesamtabklingverhalten herauschneiden und detektieren. Diese Abfrage, oder *gating* ist in Abbildung 1.3 veranschaulicht. Je kleiner das Abfragefenster  $\Delta t$  ist, desto schnellere Prozesse können aufgelöst werden. Dazu werden in allen hier diskutierten Methoden ebenfalls kurze Laserpulse verwendet. Die Zeitmessung wird dabei durch eine Ortmessung umgesetzt, da die Lichtge-

schwindigkeit eine günstige Größenordnung für die entsprechenden Zeitintervalle besitzt. Wird die Strecke, welche ein Laserpuls durch Luft zurücklegt um 30 cm verlängert, so wird er etwa 1 ns später am Detektor eintreffen. Durch die relative Streckenänderung von Anregungs- und Abfragepuls kann somit das gesamte Abklingen der Fluoreszenz abgefahren werden. Allerdings wird durch schmale Abfragefenster auch die Anzahl der detektierten Photonen sehr klein, sodass häufig hohe Integrationszeiten benötigt werden.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren können entweder direkt breitbandig aufgenommen werden, oder es werden nur die Kinetiken bei einzelnen Wellenlängen aufgenommen, aus welchen anschließend die Spektren rekonstruiert werden müssen. Letzterer Ansatz ist prinzipiell nachteilig, da Informationen über die relativen Amplituden der Zeitspuren benötigt werden. Meistens werden dazu die relativen Intensitäten bei langen Verzögerungszeiten gleichgesetzt mit denen des extern gemessenen stationären (besser zeitlich gemittelten) Spektrums. Dies kann zu einem Fehler führen, wenn das stationäre Spektrum zu größeren Anteilen aus frühen Komponenten besteht. Die Methode versagt völlig, wenn beispielsweise die Lebenszeit des angeregten Zustandes so gering ist, dass kein stationäres Spektrum erhalten werden kann.

Es ist also von Vorteil breitbandige Methoden zu verwenden, welche den gesamten zu untersuchenden spektralen Bereich gemeinsam erfassen. In den Abschnitten 1.3.1 und 1.3.2 wird daher nur auf Arbeiten verwiesen, bei welchen die Fluoreszenz gleichzeitig auf allen relevanten Wellenlängen detektiert wird.

### 1.3.1 Fluoreszenz-Aufkonversion

Eine Möglichkeit der Abfrage von fs-zeitaufgelöster Fluoreszenz mit einer (prinzipiell möglichen) Zeitauflösung von unter 100 fs ist die Summenfrequenzerzeugung (*sum frequency generation*, SFG) in nichtlinearen optischen Kristallen.<sup>[11,12,35–42]</sup> Die durch den kurzen Laserpuls (Pumpuls) angeregte Fluoreszenz wird auf einen entsprechenden Kristall (z.B.  $\beta$ -Bariumborat BBO oder Kaliumdihydrogenphosphat KDP) fokussiert. Ein zweiter, zum

Pumpimpuls zeitlich verschobener Puls (Gate-Puls) wird ebenfalls in diesen Kristall fokussiert. Wenn bestimmte Bedingungen (Phasenanpassung bzw. *phase matching*) erfüllt sind, wird ein neuer Strahl gebildet, dessen Wellenvektor  $\vec{k}_U$  der Summe der Wellenvektoren von Fluoreszenz  $\vec{k}_F$  und Gate  $\vec{k}_G$  entspricht.

$$\vec{k}_U = \vec{k}_F + \vec{k}_G \quad (1.6)$$

Der Wellenvektor  $\vec{k}_i$  ist dabei gegeben als Produkt seiner Länge  $k_i$  mit dem Einheitsvektor seiner Propagationsrichtung  $\vec{e}_i$ .

$$\vec{k}_i = k_i \vec{e}_i \quad (1.7)$$

$$k_i = 2\pi\tilde{\nu}_i n(\tilde{\nu}_i) \quad (1.8)$$

Hier ist  $\tilde{\nu}_i$  die Wellenzahl und  $n_i(\tilde{\nu}_i)$  der wellenzahlabhängige Brechungsindex des einstrahlenden Lichts.

Nichtlinear optische Kristalle weisen unterschiedliche Brechungsindizes für Licht mit verschiedener Polarisierung auf, entsprechend des Einstrahlwinkels und der optischen Achse des Kristalls (Doppelbrechung).<sup>[43]</sup> Der eintreffende Lichtstrahl spannt mit der optischen Achse die Hauptebene auf. Liegt die Polarisierung des einstrahlenden Lichts senkrecht zu dieser Ebene wird vom ordentlichen Strahl gesprochen (*ordinary*), welcher mit dem Brechungsindex  $n_o$  gebrochen wird. Ist der Strahl in der Hauptebene polarisiert, so spricht man vom außerordentlichen Strahl (*extraordinary*). Dessen Brechungsindex  $n_e$  ist abhängig vom Winkel  $\theta$  des einfallenden Strahls zur optischen Achse.

Für eine erfolgreiche SFG müssen also Einstrahlwinkel, Wellenzahlen, Polarisierungen und Kristalleigenschaften perfekt aufeinander abgestimmt sein. Sind sowohl Fluoreszenz, wie auch Gate ordentlich polarisiert, so erhält man außerordentlich polarisiertes aufkonvertiertes Licht und spricht von Typ-1 Aufkonversion (ooe).

Phasenanpassung ist hier sehr strikt, sodass kleine Abweichungen von den optimalen Bedingungen nicht akzeptiert werden. Das heißt, dass die spektrale Breite, welche bei einem

gegebenen Winkel aufkonvertiert werden kann sehr klein ist. Andererseits muss die Aufkonversionseffizienz beachtet werden, welche für diesen Fall relativ groß ist. Weiterhin ist die Geometrie relativ einfach, da beide Strahlen kollinear in den Kristall einfallen können. Für zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen auf einzelnen Wellenlängen wird daher ausschließlich Typ-1 Phasenanpassung verwendet. Im Labor von M. Chergui ist es S. Haake und Mitarbeitern außerdem gelungen, durch schnelle Rotation des Kristalls breitbandige zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren mit Typ-1 Phasenanpassung aufzunehmen.<sup>[38,39]</sup>

In der Arbeitsgruppe von Prof. Ernsting wird mithilfe von Typ-2 Aufkonversion Breitbandigkeit erzielt, indem der Gate-Strahl außerordentlich polarisiert ist (eoe).<sup>[11,12,35–37]</sup> Die Akzeptanz der Phasenanpassung ist hier deutlich besser, allerdings auf Kosten von Aufkonversionseffizienz. Weiterhin müssen Fluoreszenz und Gate in einem relativ großen Winkel zueinander auf den Kristall treffen, was ohne Pulsfrontkipfung im Gate-Strahl zu einer drastischen Verschlechterung der Zeitauflösung führt.<sup>[11,12]</sup> Dafür sorgt der Winkel für eine Hintergrundunterdrückung, da der Summenfrequenzstrahl räumlich von den Ausgangsstrahlen getrennt wird.

Ziele dieser Arbeit sind eine vollständige theoretische Beschreibung, Weiterentwicklung und Anwendung dieser Technik.

### 1.3.2 Andere Techniken

Weitere Techniken, bei welchen fs-zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren breitbandig erhalten werden können sollen kurz diskutiert werden.

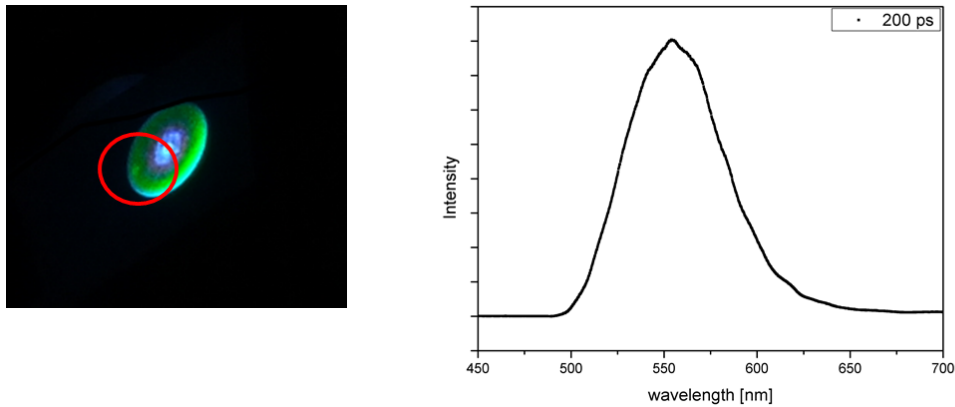
Am weitesten verbreitet ist das Kerr-Gating,<sup>[44–51]</sup> wahrscheinlich weil keine Phasenanpassung beachtet werden muss. Dabei wird in bestimmten Medien mithilfe eines kurzen Gate-Pulses eine Doppelbrechung hervorgerufen, sodass für die Länge des Gate-Pulses Fluoreszenzsignal hinter gekreuzten Polarisatoren (*Kerr-Shutter*) detektierbar ist. Die Auslöschungsrate des Polarisatorenpaars ist entscheidend für das Signal-Rausch-Verhältnis, da

die abgefragte Fluoreszenz nicht räumlich von der Ausgangsfluoreszenz getrennt ist. Allerdings führen zu dicke Polarisatoren zu schlechterer Zeitauflösung. Als Lösung wurden hier dünne Glan-Polarisatoren vorgeschlagen.<sup>[48,49]</sup> Die Zeitauflösung wird auch durch das Kerrmedium bestimmt und ist in der Regel deutlich schlechter als bei Aufkonversionssetups ( $\sim 200$  fs).

Neu vorgestellt wurde die Technik „*Transient Grating*“, welche nach Angaben der Autoren ohne störenden Hintergrund bei guter Zeitauflösung von 100 fs arbeitet.<sup>[52]</sup> Es sollten vergleichbare Proben mit Kerr-Gating, Transient Grating und Aufkonversion gemessen werden, um die Praktikabilität dieser Technik erfassen zu können.

Nichtkollineare optisch-parametrische Verstärkung (*non-collinear optical parametric amplification*, NOPA) von Fluoreszenz<sup>[53–57]</sup> ist prinzipiell eine sehr vielversprechende Technik, da die Fluoreszenz gleichzeitig abgefragt und mit einem Faktor von bis zu  $10^6$  verstärkt wird. Es können so extrem starke Signale bei guter Zeitauflösung erreicht werden, die sogar mit dem Auge sichtbar sind (zu sehen in Abbildung 1.4 links). Breitbandige Verstärkung ist ebenfalls möglich, allerdings in einem sehr schmalen Wellenlängenbereich, außerdem treten starke Verformungen des Fluoreszenzsignals auf. Das Hauptproblem dieser Technik ist der Hintergrund, welcher immer in der gleichen Größenordnung wie das Signal auftritt, da er verstärktes Rauschen darstellt. Dieser Hintergrund wird Superfluoreszenz genannt und ist als farbiger Ring hinter dem Kristall zu sehen (siehe Abbildung 1.4, links).

Ein Setup dieser Art wurde während der vorliegenden Arbeit verwirklicht (siehe Experimententeil) und Ergebnisse aus der Literatur konnten reproduziert werden. Verschiedene Techniken der Hintergrundunterdrückung, wie Lock-in oder sequentielles Messen von Signal und Hintergrund mit einem Chopper führten nicht zum gewünschten Ergebnis. Da auch die Signale bei gleichzeitiger Messung zweier Punkte auf dem Superfluoreszenzring keine Korrelation zeigten blieb nur langes integrieren. Um ein verwertbares zeitaufgelöstes Spektrum des guten Fluorophors Cumarin 153 in Methanol zu erhalten (gezeigt in Abbildung 1.4 rechts), musste beispielsweise über 100 s integriert werden.



**Abbildung 1.4:** links: Fernfeld hinter dem NOPA-Kristall, auf einem Papier. Zu sehen ist die Superfluoreszenz (bunter Ring) und die verstärkte, zeitaufgelöste Fluoreszenz (kleiner gelber Punkt, markiert durch roten Kreis). Rechts ist ein breitbandiges Fluoreszenzspektrum von Cumarin 153 250 ps nach Anregung gezeigt, wobei die Integrationszeit 100 s betrug.

Da diese prinzipiell vielversprechende Technik sich als ungeeignet herausstellte um fs-zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren zu messen, wurde in dieser Arbeit die bereits etablierte Technik der breitbandigen Fluoreszenz-Aufkonversion angewandt.



## 2 Breitbandige Fluoreszenz-Aufkonversionsspektroskopie

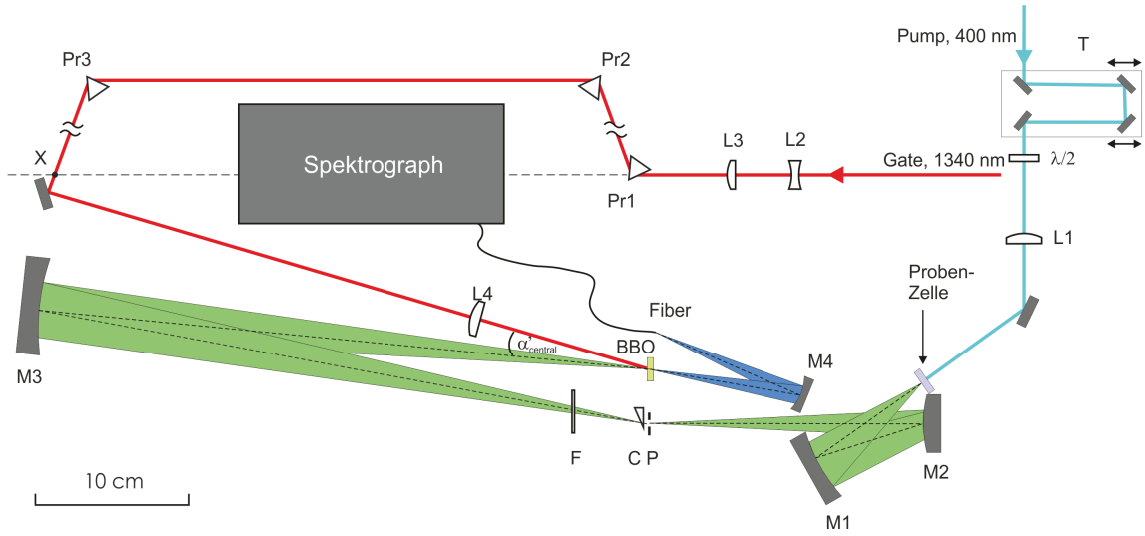
Dieser Abschnitt ist zu großen Teilen analog zu Quelle 37.

### 2.1 Experimenteller Aufbau

Der im Labor von Prof. Ernsting bestehende Aufbau des breitbandigen fs-Fluoreszenz-Aufkonversionsspektrometers (*FLuorescence UPconversion Spectrometer*, FLUPS)<sup>[11,12,35–37]</sup> wurde in dieser Arbeit verwendet und weiterentwickelt. Der Aufbau (zu sehen in den Abbildungen 2.1 und 2.2) soll hier schematisch erläutert werden, für eine umfassende Beschreibung wird auf das zusätzliche Material (*Supporting Information*) der Quelle 37 verwiesen. Die wesentliche Neuerung zu zuvor veröffentlichten Versionen<sup>[12,36]</sup> ist die Unterscheidung von zwei Mess-Modi, genannt Case A und Case B, welche sich durch eine 180°-Drehung des Kristalls um seine Oberflächennormale ineinander überführen lassen. Case A zeichnet sich gegenüber Case B (zuvor verwendet) aus durch eine deutlich erhöhte Effizienz (Faktor 3-5), zu Kosten von einem Teil der spektralen Abdeckung.

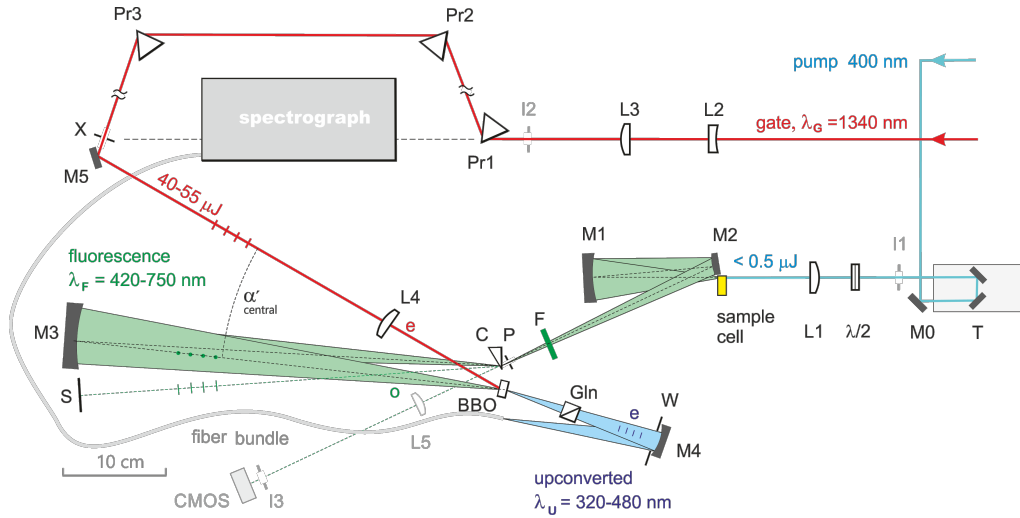
Weitere Änderungen stellen die Verwendung des neuen Filters F, der Einsatz der CMOS-Kamera zur besseren Justage, sowie kleinere Änderungen an Haltern bzw. Austausch einzelner Optiken. Die in Abbildung 2.2 dargestellte Anordnung wurde gegen Ende dieser Arbeit umgesetzt, unterscheidet sich von dem in Abbildung 2.1 dargestellten Aufbau jedoch hauptsächlich durch eine bessere Handhabbarkeit.

Verstärkte fs Laserpulse (30 fs, 500  $\mu$ J, 800 nm, 500 Hz) eines Titan:Saphir-Lasers (*Fem-*



**Abbildung 2.1:** Aufbau von FLUPS, mit welchem alle Messungen auf Kapitel 3 durchgeführt wurden.

tolaser sPro) bilden den Fundamentalstrahl und werden mittels eines Strahlteilers im Verhältnis 5:1 gespalten. Der größere Teil betreibt einen optisch parametrischen Verstärker (*LightConversion TOPAS*), welcher 60  $\mu\text{J}$  Gate-Pulse im Nahinfrarotbereich bei  $\lambda_G \sim 1340\text{ nm}$  erzeugt. Dieser Strahl wird über das Teleskop L2, L3 kollimiert und aufgeweitet und wird anschließend über einen Prismenkompressor (Pr1, Pr2, Pr3) komprimiert. Durch ein fehlendes viertes Prisma wird eine Kippung der Pulsfront erzeugt, welche die Zeitauflösung  $\Delta t$  des Setups trotz des hohen Interaktionswinkels gering hält. Diese Kippung wird durch Abbildung des Punktes X auf den Kristall BBO ( $\theta_N = 40^\circ$ ,  $\varphi_N = 0^\circ$ ) mithilfe der Linse L4 verstärkt. Genaue Justierung dieser Linse ist elementar für dieses System, da durch diese eine Vielzahl von Parametern bestimmt wird. Die Größenanpassung des Gates zur Fluoreszenz auf dem Kristall wird durch die Verkleinerung mittels L4 bestimmt, was großen Einfluss auf die Signalhöhe hat. Außerdem wird die Zeitauflösung neben der korrekten Kippung der Pulsfront auch durch die Genauigkeit der Abbildung des Punktes X auf den Kristall bestimmt. Nur so kann die Funktion des vierten Prismas eines gewöhnlichen Prismenkompressors (Parallelisierung unterschiedlich dispersiver Teilstrahlen) umgangen werden. Die Polarisation des Gates-Strahls ist dabei horizontal.



**Abbildung 2.2:** Neuer Aufbau von FLUPS, welcher gegen Ende dieser Arbeit verwirklicht wurde. Hauptunterschied zur Realisierung in Abbildung 2.1 ist die räumliche Vertauschung des Polarisators C und des Kristalls BBO, zugunsten der Handhabbarkeit. FLUPS wird in dieser Form von der Firma LIOP-TEC vertrieben.<sup>[37]</sup>

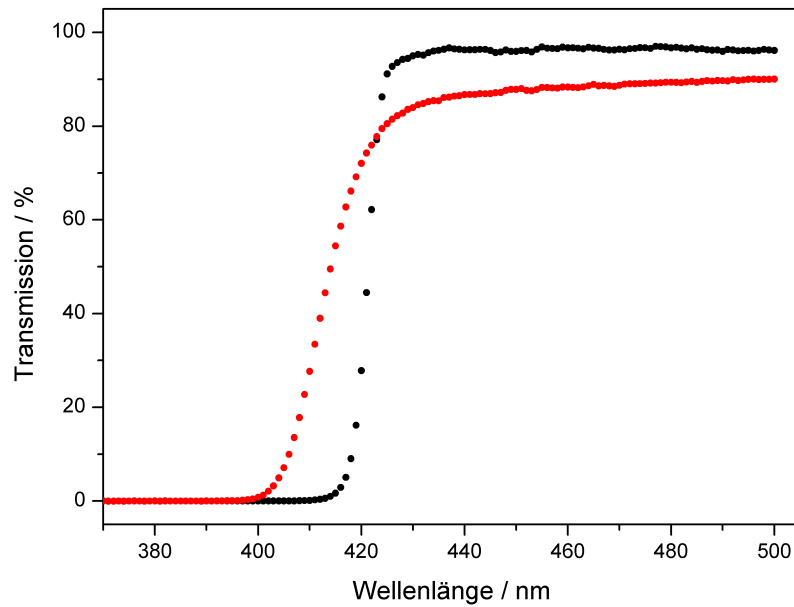
Vom kleineren Teil des Fundamentalstrahls wird in einem BBO-Kristall die zweite Harmonische (400 nm) gebildet. Die Pump-Pulse werden ebenfalls in einem Prismenkompressor komprimiert und nach Durchlauf des Tripel-Spiegels auf dem variablen Verschiebetisch T mithilfe der Linse L1 auf die 0.4 mm starke Durchfluss-Probenzelle fokussiert. Die Polarisation des Pumpstrahls wird dabei mit der  $\lambda/2$ -Platte kontrolliert, meist eingestellt auf horizontale Polarisation. Die Pumpleistung kann über Neutralsichtfilter oder die Polarisation vor dem Verdopplungskristall eingestellt werden.

Die emittierte Fluoreszenz wird in einem nicht-achsialen Schwarzschild-Teleskop (M1,M2) gesammelt und mit siebenfacher Vergrößerung auf das Calcitprisma C fokussiert. Dieses polarisiert die Fluoreszenz mittels Doppelbrechung in horizontal und vertikal polarisiertes Licht, wobei nur letzteres durch den Hohlspiegel M3 auf den Kristall 1:1 abgebildet wird. Der Winkel zwischen dem Zentralstrahl der Fluoreszenz und dem Gate ist bezeichnet mit  $\alpha'_{central}$ .

Die aufkonvertierte Fluoreszenz ( $\lambda_U = 320 - 480 \text{ nm}$ ) wird durch den Spiegel M4 1:1 auf den Eingang eines Fiberbündels abgebildet, sodass sie zum Gitterspektrographen geleitet werden kann. Dieser ist mit einer sensiblen rechteckigen CCD-Kamera (*Andor A-DU420-BU*, 1024x256 Pixel) ausgestattet. Alle 256 Pixel einer Spalte sind verbunden (*full vertical binning*), sodass das Gitter die aufkonvertierte Fluoreszenz auf 1024 Pixel (bzw. 512 nach *horizontal binning*) in der Breite dispergiert. Licht des Gates in Progradationsrichtung und die nicht-aufkonvertierte Fluoreszenz werden durch einen Glan-Filter G und Spatialfilter W unterdrückt.

Da bereits wenige Photonen von Störquellen das erhaltene Signal signifikant überlagern, ist eine Unterdrückung des intensiven Pumplichts essentiell. Nicht absorbierte Anteile des Pumpstrahls werden vor dem Spiegel M1 abgeblockt. Gestreutes Pumplicht wird durch den dielektrischen Langpassfilter (*Asahi, ASA ZUL0422*) F abgeschwächt, welcher sich gegenüber dem zuvor verwendeten Grünglasfilter (*Schott GG420*) durch überlegene Steilheit und Transmission bei höheren Wellenlängen auszeichnet, wie in Abbildung 2.3 gezeigt ist. Da die ursprüngliche Polarisation des Pumplichts perpendicular zu dem als Analysator fungierenden Calcits C ist, wird der Hauptteil des übrigen Pumplichts zusammen mit der horizontal polarisierten Fluoreszenz abgeblockt (S).

Wie bereits erwähnt, stellt der Winkel der Gate-Pulsfront den wichtigsten Faktor für die Zeitauflösung dar und wird durch die Entfernung von L4 zum Kristall bestimmt. In dieser Arbeit wurde ein einfaches Verfahren implementiert um den optimalen Abstand zu finden, welches auf der räumlichen Auflösung der Kreuzkorrelation von Pump und Gate basiert.<sup>[11,12]</sup> Es wurde direkt vor der Fiber ein vertikaler Spalt eingesetzt, dessen Halter auf einem Verschiebetisch befestigt ist. Wird nun das Signal um  $t = 0$  zeitlich abgefahren bei verschiedenen Positionen des Spalts, so wird das räumliche Profil der Kreuzkorrelation erhalten, da M4 die Interaktionszone von Gate und Pump im Kristall 1:1 auf die Fiber abbildet. Die optimale Position von L4 ist erreicht, wenn die Maximalstellen der Zeitspuren für jede Position des Spalts identisch sind. Es wird insgesamt eine Zeitauflösung von



**Abbildung 2.3:** Vergleich der wellenlängenabhängigen Transmission des Filters von Asahi (schwarz) und von Schott (rot). Der Asahi Filter blockt die Flanke des Pumplichts bei höheren Wellenlängen ( $<420$  nm) deutlich besser ab und weist zusätzlich eine höhere Transmission im Bereich der Fluoreszenz auf ( $>420$  nm).

unter 100 fs erreicht, gemessen an der Kreuzkorrelation von Pump und Gate.

## 2.2 Datenverarbeitung

Jedes aufkonvertierte Fluoreszenzspektrum wird auf dem Detektor als „technische“ Verteilung der Anzahl an Photonen über die Pixel  $p$ , geschrieben als  $s^{(U)}(p)$  detektiert. Um daraus die gewünschten „wahren“ Fluoreszenzspektren zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Anregung zu erhalten, müssen Schritte der Datenverarbeitung durchgeführt werden. Die gesamte Auswertung erfolgte dabei mittels des MatLab-Programms SPAN, Origin und selbstgeschriebenen Mathematica-Programmen.

Die Kalibrierung  $p(\lambda_U)$  für den Spektrographen ist linear und kann über die Messung von Quecksilberlinien erhalten werden. Diese Kalibrierfunktion muss nur erneuert werden, wenn Änderungen am Spektrographen vorgenommen werden. Ein Beispiel hierfür ist eine Drehung des Gitters, um einen anderen Wellenlängenbereich auf die CCD-Kamera zu dispergieren. Es wird also die Verteilung  $s^{(U)}(\lambda_U)$  der Anzahl der Photonen über die Wellenlängen  $\lambda_U$  erhalten. Das Signal-Rausch-Verhältnis kann dabei über längere Integrationszeiten und Mittelung über mehrere Messreihen verbessert werden. Bei längeren Integrationszeiten können kosmische Spikes auftreten, welche automatisiert entfernt werden. Dabei wird die Intensität auf jedem Pixel verglichen mit dem Wert einer linearen Funktion, gebildet aus Intensitäten benachbarter Pixel. Weicht die Differenz stärker ab als ein voreingestellter Schwellenwert, so wird der berechnete Funktionswert verwendet. [58] Der Prozentsatz an korrigierten Werten liegt dabei für eine Integrationszeit von 1.5 s unter 0.01 %.

Weiterhin müssen die Spektren auf Dispersionseffekte korrigiert werden. Nach Anregung in der Zelle durchläuft die Fluoreszenz die Probenlösung (im Mittel etwa 0.2 mm Weglänge), das Austrittsfenster der Zelle, den Filter, das Calcitprisma und Teile des Kristalls. In allen diesen Medien wird eine Dispersion der Gruppengeschwindigkeit erzeugt. Um dies zu korrigieren werden transiente Spektren von einem unpolaren Fluoreszenzfarbstoff aufgenommen, welcher möglichst wenig spektrale Relaxation aufweist. Anhand der Spektren

wird eine Korrekturfunktion gesucht, welche die Kinetiken für jeden Pixel vereint. Der Farbstoff sollte in einem Solvens gelöst sein, welches einen vergleichbaren Brechungsindex aufweist zu dem der zu untersuchenden Probe. Für die Solvatationsmessungen in wässrigen Lösungen wurden transiente Spektren von BBOT in Methanol aufgenommen, um die transienten Spektren zu korrigieren.<sup>[12]</sup>

Letztlich müssen die Spektren photometrisch korrigiert werden, da die Effizienzen von Gitter, CCD-Kamera und vor allem der Aufkonversionsprozesses im Kristall wellenlängenabhängig sind. Dies wird gesondert im nächsten Abschnitt dargelegt.

## 2.3 Photometrische Korrektur

In diesem Abschnitt sollen anhand von Vorhersage und Messungen von photometrischen Korrekturfunktionen die beiden in dieser Arbeit unterschiedenen Mess-Modi Case A und Case B erläutert werden. Durch eine qualitativ richtige Vorhersage kann gezeigt werden, dass der Prozess im Kristall für die breitbandige Fluoreszenz-Aufkonversion nun vollständig verstanden ist.

### 2.3.1 Vorhersagen einer photometrischen Korrekturfunktion

Der hier beschriebene Algorithmus zur Vorhersage einer Korrekturfunktion wurde zusammen mit Genaro Bierhance im Rahmen seiner Bachelorarbeit entwickelt.<sup>[37,59]</sup>

Gesucht wird eine Korrekturfunktion  $CF(\lambda_U)$ , welche bei punktwiser Multiplikation mit  $s^{(U)}(\lambda_U)$  die wahre spektrale Verteilung der aufkonvertierten Fluoreszenz  $f^{(U)}(\lambda_U)$  ergibt:

$$f^{(U)}(\lambda_U) = s^{(U)}(\lambda_U) \cdot CF(\lambda_U) \quad (2.1)$$

Die Wellenlänge der aufkonvertierten Fluoreszenz  $\lambda_U$  ist bestimmt durch die Fluoreszenzwellenlänge  $\lambda_F$  und die Gatewellenlänge  $\lambda_G$ :

$$\lambda_U = \left( \lambda_F^{-1} + \lambda_G^{-1} \right)^{-1} \quad (2.2)$$

In diesem Abschnitt soll  $CF(\lambda_U)$  abgeschätzt werden. Es setzt sich zusammen aus der nichtlinearen Aufkonversionseffizienz  $\eta_{total}(\lambda_U)$ , die Kristallparameter beinhaltet und der Detektionseffizienz  $T(\lambda_U)$ , welche durch Gitter und CCD-Kamera hervorgerufen wird:

$$CF(\lambda_U) \sim (\eta_{total}(\lambda_U)T(\lambda_U))^{-1} \quad (2.3)$$

Ist der Anteil der Leistung, welche vom Gate (G) auf die aufkonvertierte Fluoreszenz (U) übertragen wird klein, so ist die Aufkonversionseffizienz  $\eta_{total}$  (in elektrostatischen



cgs-Einheiten) gegeben durch: <sup>[11,31]</sup>

$$\eta_{total} = \frac{2^7 \pi^3 I_G}{c^3} \left\{ \frac{\omega_U \omega_F d_{eff}^2}{n_e(\tilde{\nu}_U) n_o(\tilde{\nu}_F) n_e(\tilde{\nu}_G)} \right\} \left[ \frac{\sin(\Delta k L / 2)}{\Delta k L / 2} \right]^2 L^2 \quad (2.4)$$

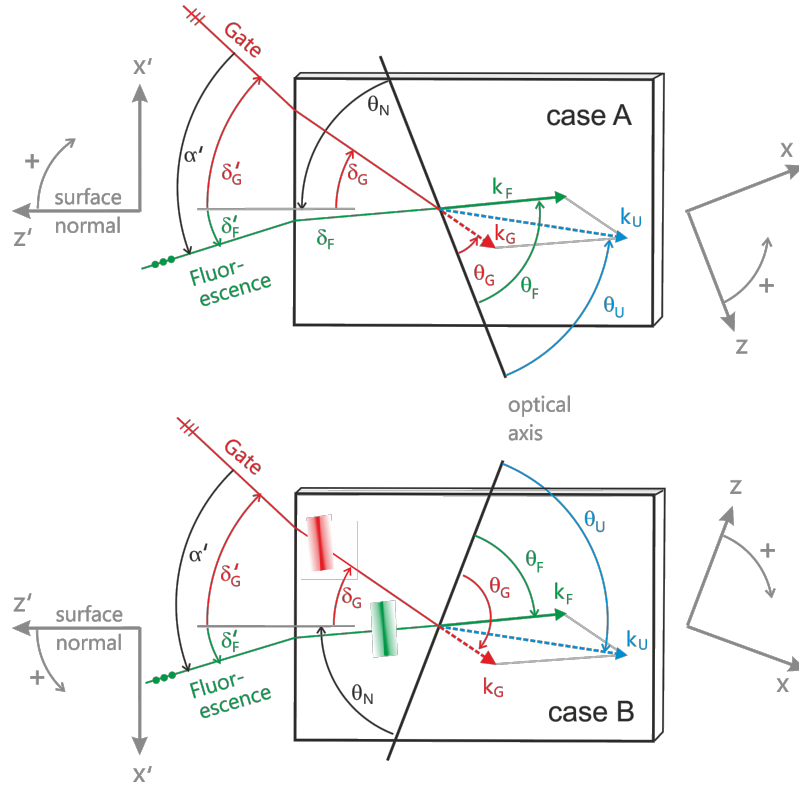
Hier ist  $I_G$  die Intensität des Gates,  $c$  die Lichtgeschwindigkeit,  $\tilde{\nu} = 1/\lambda$  die Wellenzahl,  $\omega = 2\pi c\tilde{\nu}$  die Winkelfrequenz,  $n$  der Brechungsindex,  $d_{eff}$  die effektive Nichtlinearität,  $\Delta k$  die Phasendiskrepanz (*phase mismatch*) und  $L$  die Dicke des Kristalls.

Da ab diesem Punkt eine Vielzahl von Winkelabhängigkeiten auftreten, müssen Koordinatensysteme festgelegt werden. Diese sind in Abbildung 2.4, einer Vergrößerung der Interaktionszone des Kristalls, dargestellt. Es werden 2 Koordinatensysteme definiert, welche sich an der Kristall-Oberflächennormalen (links) und an der optischen Achse (rechts) orientieren. Beim externen Koordinatensystem (links) ist  $\vec{z}'$  die Oberflächennormale des Kristalls und  $\vec{x}'$  diejenige horizontale Achse in der Tischebene, welche näher zur optischen Achse liegt. Die Eingangswinkel  $\delta'$  in  $\vec{x}'$ -Richtung sind damit positiv. Das interne Koordinatensystem des Kristalls (rechts) nutzt die optische Achse als  $\vec{z}$ , wobei positive Werte in Richtung der Ausgangsseite (rechts) erhalten werden. Orthogonal dazu in der Tischebene, ebenfalls positiv in Richtung der Ausgangsseite verläuft  $\vec{x}$ . Zur besseren Unterscheidung von den internen Winkeln werden externe Winkel mit einen „ ‘ “ gekennzeichnet.

Da G und die U außerordentlich polarisiert sind, hängen die entsprechenden Brechungsindizes  $n_e$  von den internen Winkeln  $\theta_G$  und  $\theta_U$  ab.

$$n_e(\theta) = n_o \sqrt{\frac{1 + \tan^2 \theta}{1 + (n_o/n_e^M)^2 \tan^2 \theta}} \quad (2.5)$$

Die Hauptwerte  $n_e^M$  und  $n_o$  sind wellenlängenabhängig und können über die Sellmeier-Gleichungen des entsprechenden Kristalls erhalten werden. Hier wurden folgende Sellmeier-



**Abbildung 2.4:** Vergrößerte Draufsicht der Interaktionszone des nichtlinear optischen Kristalls für die Fluoreszenz-Aufkonversion. Fluoreszenz und Gate gelangen im Interaktionswinkel  $\alpha'$  von links in den Kristall, die Ausgangsseite ist rechts. Die zwei Mess-Modi Case A und Case B werden unterschieden durch die Reihenfolge, in welcher  $\vec{k}_F$  und  $\vec{k}_G$  interne Winkel mit der optischen Achse einschließen. Im unteren Teil ist außerdem die Kippung der Gate-Pulsfront dargestellt, durch welche sich Zeitaufösungen von 100 fs bewerkstelligen lassen.

Gleichungen für BBO benutzt:<sup>[43]</sup>

$$n_o(\lambda)^2 = 2.7359 + \frac{0.01878}{\lambda^2 - 0.01822} - 0.01354 \lambda^2 \quad (2.6)$$

$$n_e^M(\lambda)^2 = 2.3753 + \frac{0.01224}{\lambda^2 - 0.01667} - 0.01516 \lambda^2 \quad (2.7)$$

Die photometrische Korrektur soll für unterschiedliche Winkel des Kristalls um die Tischnormale Achse bestimmt werden. Dies entspricht einer Variation des Eingangswinkels  $\delta'_F$  der Fluoreszenz, wobei der Winkel zwischen Fluoreszenz und Gate  $\alpha'$  fest bleibt und der

Eingangswinkel des Gates somit durch  $\alpha' = \delta'_F - \delta'_G$  gegeben ist. Der innere Winkel  $\theta_G$  zur optischen Achse wird über den Schnittwinkel  $\theta_N$  des Kristalls aus dem inneren Eingangswinkel  $\delta_G$  erhalten.

$$\theta_G = \theta_N - \delta_G \quad (2.8)$$

Dieser ist über das Snelliussche Brechungsgesetz mit dem externen Eingangswinkel  $\delta'_G$  verbunden, wobei der Brechungsindex wiederum von  $\theta_G$  abhängig ist:

$$\sin \delta'_G = n_e(\tilde{\nu}_G, \theta_G) \sin(\delta_G) \quad (2.9)$$

Nicht nur  $n$ , auch  $\Delta k$  und  $d_{eff}$  sind winkelabhängig. Um die Phasendiskrepanz  $\Delta k$  zu berechnen wird die Summe der Vektoren von Gate und Fluoreszenz bestimmt, wobei die zuvor bestimmten inneren Winkel  $\theta_G$  und  $\theta_F$  eingesetzt werden.  $\theta_F$  wird analog zu  $\theta_G$  berechnet, dabei muss allerdings der ordentliche Brechungsindex  $n_o$  verwendet werden.

$$\vec{k}_U = \vec{k}_F + \vec{k}_G = 2\pi\tilde{\nu}_F n_o(\tilde{\nu}_F) \begin{pmatrix} \cos \theta_F \\ \sin \theta_F \end{pmatrix} + 2\pi\tilde{\nu}_G n_e(\tilde{\nu}_G, \theta_G) \begin{pmatrix} \cos \theta_G \\ \sin \theta_G \end{pmatrix} \quad (2.10)$$

Mithilfe des Skalarprodukts dieses Vektors  $\vec{k}_U$  und der optischen Achse wird der Winkel  $\theta_U$  erhalten.

$$\theta_U = \arccos \frac{\vec{k}_U \cdot \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}}{|\vec{k}_U|} \quad (2.11)$$

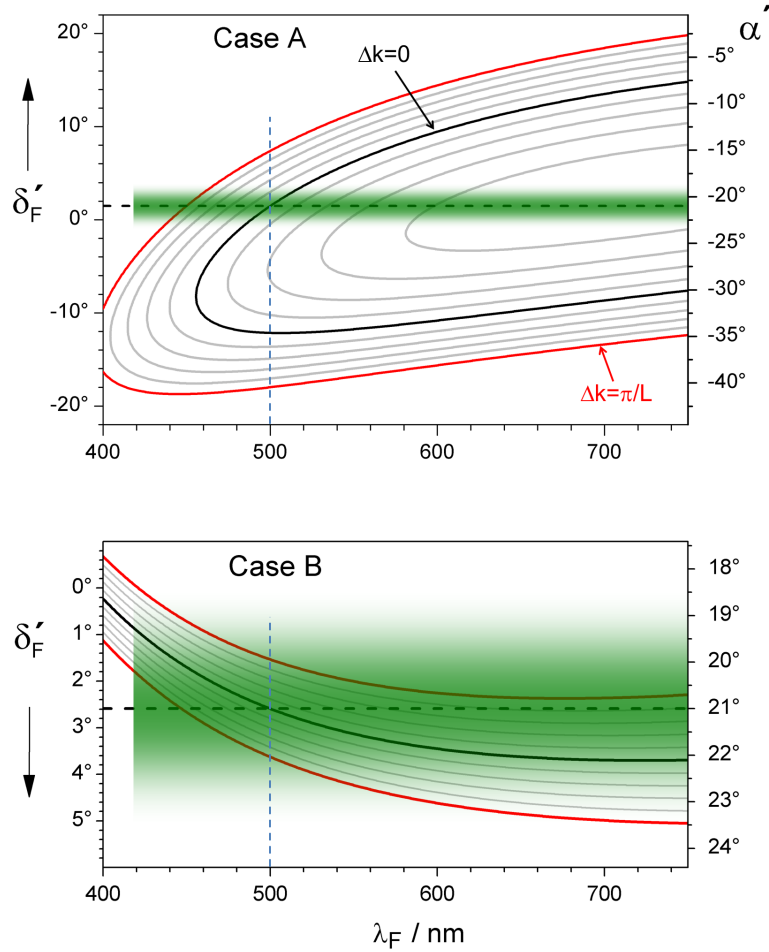
Es wird nun die Differenz des Betrags  $|\vec{k}_U|$  und der Länge, welche ein Vektor mit diesem Winkel  $\theta_U$  und der Wellenzahl  $\tilde{\nu}_U$  haben würde, gebildet. Diese Differenz ist die Phasendiskrepanz  $\Delta k$ :

$$\Delta k = |\vec{k}_U| - 2\pi\tilde{\nu}_U n_e(\tilde{\nu}_U, \theta_U) \quad (2.12)$$

Von perfekter Phasenanpassung (*phase matching*) wird gesprochen, wenn diese Differenz 0 ergibt. Betrachtet man  $\Delta k$  als eine Funktion des externen Fluoreszenzwinkel  $\delta'_F$ , so findet man für jede Fluoreszenzwellenlänge  $\lambda_F$  zwei Nullstellen  $\Delta k = 0$ . Diese beiden Konfigurationen der Phasenanpassung entsprechen den Mess-Modi Case A und Case B, welche in Abbildung 2.4 dargestellt sind. Bei Case A ist  $\vec{k}_G$  näher an der optischen Achse und  $\vec{k}_F$  weiter entfernt, bei Case B ist es umgekehrt.

Aufkonvertiert wird die Fluoreszenz allerdings nicht nur bei perfekter Phasenanpassung ( $\Delta k = 0$ ), sondern auch bei leichter Abweichung. In Abbildung 2.5 werden  $\delta'_F(\lambda_F)$  Kurven für perfekte Phasenanpassung bei Case A und Case B gezeigt (schwarze Linien), für  $|\alpha'_{central}| = 21^\circ$ . Diese sind umgeben von Regionen, in welchen Toleranz-Phasenanpassung<sup>[43]</sup> ( $0 < |\Delta k| < \pi/L$ ) vorliegt. Sie wurden berechnet unter der Annahme, dass der Kristall so um die Tisch-normale Achse gedreht und fixiert wurde, dass bei 500 nm perfekte Phasenanpassung vorliegt. Dadurch ist eine Änderung von  $\delta'_F$  hier mit einer Änderung von  $\alpha'$  verbunden (rechte Skalen). Dies entspricht dem Experiment, da hier bei einer gegebenen Konfiguration die Fluoreszenz in einem Winkel von M3 auf den Kristall fokussiert wird. Dieser Kegel ( $\pm 2.5^\circ$ ) ist als grüner Streifen in Abbildung 2.5 eingezeichnet. Die Topologie der Toleranzregionen ist deutlich verschieden für die Mess-Modi. In Case A (oben) sind die Winkel  $\delta'_F$  bzw.  $\alpha'$ , welche die Phasenanpassungsbedingung erfüllen, stark abhängig von der Fluoreszenzwellenlänge. Dies zeigt sich im ausgeprägten Anstieg der schwarzen Linie - über den gesamten Fluoreszenzkegel von  $5^\circ$  werden nur 40 nm abgedeckt. Da trotzdem ein breitbandiges Spektrum erhalten wird, ist das Signal hauptsächlich durch Toleranzphasenanpassung generiert worden. Weiterhin ist aus dem oberen Teil von Abbildung 2.5 ersichtlich, dass der Fluoreszenzkegel für  $\lambda_F > 440$  nm vollständig im Toleranzbereich liegt. Es folgt, dass für Case A große Teile des Fluoreszenzkegels verwendet werden können. Dies wurde experimentell überprüft, indem unter Beobachtung der Signalhöhe Teile von M3 abgedeckt wurden.

Bei Case B (unterer Teil von Abbildung 2.5) ist der Anstieg der schwarzen Linie (perfekte



**Abbildung 2.5:** Äußere Fluoreszenzwinkel  $\delta'_F$  in Abhängigkeit von  $\lambda_F$  bei  $|\alpha'_{central}| = 21^\circ$ . Der Kristall ist fixiert auf eine Konfiguration, die perfekte Phasenanpassung bei 500 nm für den Zentralstrahl des Fluoreszenzkegels ermöglicht (gestrichelte schwarze bzw. grün schattierte Fläche). Zu beachten sind die unterschiedlichen vertikalen Skalen in den beiden Diagrammen. Bei Case A ist die Dispersion der perfekten Phasenanpassung (schwarze Linie) sehr stark, aber Toleranzphasenanpassung (graue und rote Linien) möglich. Für Case B ist die Situation umgekehrt.

Phasenanpassung) deutlich geringer. Im Bereich  $\lambda_F = 430 - 750$  nm beträgt die Änderung des Winkels nur  $4^\circ$ . Allerdings ist auch der Toleranzbereich sehr klein, sodass Teile des Fluoreszenzkegels außerhalb von diesem liegen und damit ungenutzt bleiben. Um diese

Verluste zu minimieren wird eine geringe Winkeldispersion der Fluoreszenz, angepasst an die Akzeptanz von Case B, durch das Calcit-Prisma C eingeführt. Dies ist wiederum nachteilig für perfekte Phasenanpassung bei Case A, da hier der Anstieg der Winkelakzeptanz genau entgegengesetzt ist. Doch wie bereits beschrieben, wird das Signal in diesem Fall fast ausschließlich durch Toleranz-Phasenanpassung erzeugt.

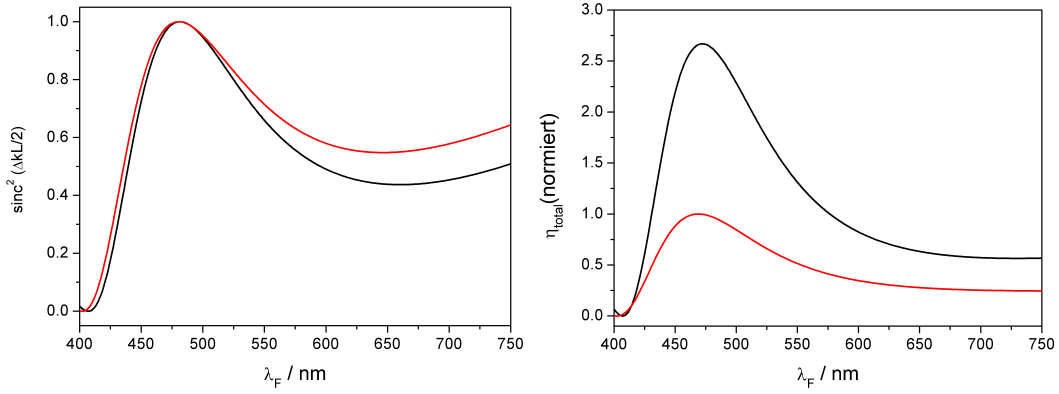
Die bessere Nutzung des gesamten Fluoreszenzkegels erklärt ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis bei Case A gegenüber Case B, allerdings nicht den im Experiment beobachteten Faktor von etwa 3 bis 5. Dafür soll nun die Aufkonversionseffizienz  $\eta_{total}$  für beide Mess-Modi verglichen werden.

Die Phasendiskrepanz  $\Delta k$ , also die Abweichung zur perfekten Phasenanpassung, geht über den quadrierten Sinus cardinalis Term  $\text{sinc}^2(\Delta k L/2)$  in  $\eta_{total}$  ein, welcher in Gleichung 2.4 in eckigen Klammern dargestellt ist. Dieser erreicht sein Maximum von 1, wenn das Argument gegen 0 strebt, also bei perfekter Phasenanpassung. Für Case A und Case B sind links in Abbildung 2.6 diese Teileffizienzterme gegen die Fluoreszenzwellenlänge  $\lambda_F$  aufgetragen. Die entsprechenden Winkel wurden dabei bei einem  $|\alpha'_{central}| = 23^\circ$  so optimiert, dass für  $\lambda_F = 500 \text{ nm}$  perfekte Phasenanpassung vorliegt. Die entsprechenden  $\delta'_F$  sind  $-0.77^\circ$  für Case A und  $0.65^\circ$  für Case B. Es ist deutlich zu sehen, dass die Effizienz für Case B abseits des Maximums höhere Werte als für Case A annimmt. Dies ist der Grund für die geringere Bandbreite von Case A.

Bei gegebener Gate-Intensität  $I_G$  sind in Gleichung 2.4 alle Größen bis auf die effektive Nichtlinearität  $d_{eff}$  beschrieben. In der kontrahierten Schreibweise ist diese für BBO und Typ-2 Phasenanpassung gegeben durch<sup>[43,60]</sup>

$$d_{eff} = d_{22} \cos \theta_U \cos \theta_G \cos(\varphi_U + \varphi_F + \varphi_G) + d_{15} \cos \theta_U \sin \theta_G \sin(\varphi_U + \varphi_F) + d_{31} \sin \theta_U \cos \theta_G \sin(\varphi_G - \varphi_F) \quad (2.13)$$

Alle Winkel  $\varphi$  sind dabei Null für den verwendeten Kristall, wenn nur die horizontale Ebene betrachtet wird. Daher muss lediglich der erste Term betrachtet, und  $d_{22}$  ermittelt



**Abbildung 2.6:** Links: Auftragung der Aufkonversionseffizienz, welche durch Phasenanpassung hervorgerufen wird ( $\text{sinc}^2(\Delta k L/2)$ ) gegen die Fluoreszenzwellenlänge. Gezeigt werden die Kurven für Case A (schwarz) und Case B (rot), beide jeweils optimiert für perfekte Phasenanpassung bei  $\lambda_F = 500 \text{ nm}$ . Die höhere Effizienz für Case B abseits des Maximums ist der Grund für die bessere Bandbreite von Case B. Rechts: Gesamte Aufkonversionseffizienz, normiert auf das Maximum von Case B als Funktion von  $\lambda_F$  für diesen Winkel. Hier ist die hohe Effizienz von Case A im Maximum zu sehen.

werden. Dieser Wert wurde für die Generation der zweiten Harmonischen (*second harmonic generation*, SHG) eines Nd:YAG-Lasers in einem BBO-Kristall bestimmt.<sup>[61]</sup>  $d_{22}$  entspricht in der nicht-kontrahierten Schreibweise  $d_{yyy}$ , welches proportional zur Suszeptibilität der zweiten Ordnung  $\chi_{yyy}^{(2)}$  ist. Diese kann nach der Regel von Miller aus den Suszeptibilitäten der ersten Ordnung  $\chi_{yy}^{(1)}$  der drei involvierten Strahlen und dem Faktor  $\Delta_{yyy}$  (Millers Koeffizient) erhalten werden.<sup>[62]</sup>

$$d_{22} = d_{yyy} = K \chi_{yyy}^{(2)} = K \left[ \chi_{yy}^{(1)}(\tilde{\nu}_F) \right] \left[ \chi_{yy}^{(1)}(\tilde{\nu}_G) \right] \left[ \chi_{yy}^{(1)}(\tilde{\nu}_U) \right] \Delta_{yyy} \quad (2.14)$$

Der Proportionalitätsfaktor K, welcher Suszeptibilität und Nichtlinearität verbindet, besitzt den Wert 1 für SFG und 0.5 für SHG. Die Suszeptibilitäten der ersten Ordnung werden wie folgt berechnet:<sup>[43]</sup>

$$\chi_{yy}^{(1)}(\tilde{\nu}) = n_o^2(\tilde{\nu}) - 1 \quad (2.15)$$

Millers Koeffizient  $\Delta_{yyy}$  wird also mit dem bekannten  $d_{22}$  aus der SHG des YAG-Lasers bestimmt (1064, bzw. 532 nm), und als konstant für den gesamten, hier betrachteten Wellenlängenbereich angenommen. Für jede Fluoreszenzwellenlänge  $\lambda_F$  wird  $d_{22}$  und damit nach Gleichung 2.13  $d_{eff}$  ermittelt. Es kann nun die gesamte Aufkonversionseffizienz  $\eta_{total}$  berechnet werden. Dies ist in Abbildung 2.6 rechts für die bereits beschriebenen Konfigurationen für perfekte Phasenanpassung bei 500 nm gezeigt. Hier zeigt sich der Hauptanteil für die hohe Effizienz von Case A. Die Ursache ist in Gleichung 2.13 zu finden. Da in Case A sowohl  $\theta_G$ , wie auch  $\theta_U$  kleiner sind als bei Case B (siehe Abbildung 2.4) nehmen die Cosinus-Terme deutliche höhere Werte an, wodurch eine höhere Aufkonversionseffizienz  $\eta_{total}$  erhalten wird.

Mithilfe von Gleichung 2.3 können zusammen mit der technischen Detektionseffizienz  $T(\lambda_U)$ , welche aus Herstellerspezifikationen für Gitter und Kamera interpoliert wurde, photometrische Korrekturfunktionen für beliebige Konfigurationen und Wellenlängen berechnet werden. Beispiele hierfür sind in den Abbildungen 2.8 und 2.9 im Vergleich zu den experimentell bestimmten Funktionen dargestellt.

### 2.3.2 Experimentelle Bestimmung photometrischer Korrekturfunktionen

Die Erstellung der photometrischen Korrekturkurven erfolgte im Prinzip ähnlich zum zuvor veröffentlichten Weg.<sup>[12]</sup> Die hier vorgestellte Prozedur wurde in Kooperation mit Arnulf Rosspeintner von der Université de Genève erstellt. Sie hat den Vorteil, dass die Auswertung automatisiert erfolgt. Dadurch ist sie zum einen schnell genug, um sie zur täglichen Kontrolle durchzuführen und zum anderen reproduzierbar, da keine willkürlichen Schritte durchgeführt werden müssen.

Als Referenz wurden stationäre Fluoreszenzspektren von Standardfarbstoffen Bis(5-*tert*-butyl-2-benzoxazolyl)thiophen (BBOT), Cumarin 6H (C6H), Cumarin 153 (C153) und 4-(Dicyanomethyl)-2-methyl-6-(4-dimethyl-amino-styryl)-4-H-pyran (DCM) gemessen. Das Fluorimeter wurde dafür mit einer sekundären Standardlampe der Bundesanstalt für Ma-



**Tabelle 2.1:** Parameter für Fits mit Lognormal-Funktionen von Fluoreszenzspektren über Wellenzahlen der Standardfarbstoffe BBOT, C6H, C153 und DCM in Acetonitril (Anregung bei 400 nm).

	$\tilde{\nu}_0 / \text{cm}^{-1}$	$\Delta / \text{cm}^{-1}$	$\gamma$	$h$
BBOT	24606	593	0.0825	0.1094
	24109	2473	-0.8550	0.5046
	23088	1038	-0.2180	0.4131
	21756	1058	-0.0216	0.2105
	21538	3665	0.5467	0.2328
	19968	3324	0.5563	0.0754
C6H	21218	2871	-0.2757	0.7322
	22118	2089	-0.1113	0.3552
C153	18803	3287	-0.2771	0.9333
	19589	1339	-0.0760	0.1206
DCM	15499	2798	-0.1687	0.2290
	15955	2245	0.0298	0.7641

terialprüfung kalibriert. Die Referenzspektren werden als Photonenverteilung über Wellenzahlen  $f_i^{(F)}(\tilde{\nu}_F)$  mit Summen von Lognormal-Funktionen beschrieben:<sup>[63]</sup>

$$f_i^{(F)}(\tilde{\nu}_F) = \sum \log \text{norm}(\tilde{\nu}_F) \quad (2.16)$$

$$\log \text{norm}(\tilde{\nu}_F) = h \begin{cases} \exp [-\ln 2 \{\ln (1 + \alpha) / \gamma\}^2] & : a > -1 \\ 0 & : a \leq -1 \end{cases} \quad (2.17)$$

$$a = 2\gamma(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_p) / \Delta \quad (2.18)$$

Dabei ist  $\tilde{\nu}_0$  die Peak Wellenzahl,  $\Delta$  die Bandenbreite,  $\gamma$  die Asymmetrie und  $h$  die Amplitude. Die Parameter für die Fits sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Die entsprechenden

Photonenverteilungen über Wellenlängen sind über folgende Gleichung erhältlich:

$$f_i^{(F)}(\lambda_F) = f_i^{(F)}(\tilde{\nu}_F) \cdot \lambda_F^2 \quad (2.19)$$

Das FLUPS-Spektrometer wird für eine Messung auf Case A bzw. Case B und einen festen Winkel  $\delta'_{Fcentral}$  eingestellt. Die beiden Mess-Modi können per Auge unterschieden werden. Durch die hohe Intensität des Gates ist seine zweite Harmonische immer sichtbar hinter dem Kristall. Die Mess-Modi zeichnen sich bei Drehung des Kristalls um seine Oberflächennormale als Minima aus, wobei Case A ein lokales, Case B das globale Minimum bildet. Nun wird der Kristall um seine Tisch-normale Achse gedreht (mithilfe des kalibrierten Rotationstisches, auf welchem er befestigt ist), um den Winkel  $\delta'_{Fcentral}$  einzustellen, bei welchem auch die zu untersuchende Probe gemessen werden soll.

Aufkonvertierte Fluoreszenzspektren von Lösungen jedes Standardfarbstoffs  $i$  ( $OD < 0.4$ ) in Acetonitril werden nun bei 250 ps gemessen. Bei dieser späten Zeit nach Anregung sind alle Verschiebungen und Änderungen der Bandenform beendet. Außerdem ist die spektrale Relaxation in Acetonitril, verglichen mit der Lebensdauer des angeregten Zustands, so schnell, dass das Spektrum bei 250 ps dem stationären entspricht. Es werden 30 Messungen des aufkonvertierten Spektrums gemittelt und somit  $s_i^{(U)}(\lambda_U)$  erhalten. Diese werden so begrenzt, dass nur Teile, welche 15% des Maximums betragen, verwendet werden. Das Spektrum der Standardabweichungen von diesem Mittel ist  $\sigma_i(\lambda_U)$ .

Die Referenzspektren  $f_i^{(F)}(\lambda_F)$  werden *in silico* aufkonvertiert, um die Photonenveteilung über aufkonvertierte Wellenlängen  $\lambda_U$  zu erhalten, welche auf dem Detektor erwartet wird. Dafür wird die Gate-Wellenlänge benötigt, welche entweder extern, oder iterativ innerhalb dieser Prozedur bestimmt wird.

$$f_i^{(F)}(\lambda_U) = f_i^{(F)}(\lambda_F) \cdot \lambda_F^2 \cdot \lambda_U^{-2} \quad (2.20)$$

Die partielle Korrekturfunktion  $CF_i$  für jeden Farbstoff  $i$  ist damit gegeben als:

$$CF_i = f_i^{(U)}(\lambda_U) / s_i^{(U)}(\lambda_U) \quad (2.21)$$

Um diese reproduzierbar zu einer gesamten Korrekturfunktion zusammenzuführen, wird eine Prozedur von Gardecki und Maroncelli verwendet.<sup>[64]</sup> Dabei wird für jede partielle Korrekturfunktion  $CF_j$  ( $j \geq 2$ ) zunächst ein relativer Normalisierungsfaktor  $\alpha_j$  zu seiner benachbarten partiellen Korrekturfunktion  $CF_{j-1}$  aus der Überlappungsregion bestimmt.

$$\alpha_j = \frac{\sum_{\lambda_U} [(CF_{j-1}(\lambda_U) / CF_j(\lambda_U)) / \sigma_{j-1,j}^2(\lambda_U)]}{\sum_{\lambda_U} [1 / \sigma_{j-1,j}^2(\lambda_U)]} \quad (2.22)$$

Die Wichtung erfolgt dabei über die Varianz  $\sigma_{j-1,j}^2$ , welche aus den Spektren der Standardabweichungen  $\sigma_i(\lambda_U)$  erhalten wird.

$$\sigma_{j-1,j}^2(\lambda_U) = \left( \frac{1}{\sigma_{j-1}(\lambda_U)} + \frac{1}{\sigma_j(\lambda_U)} \right) \left( \frac{CF_{j-1}(\lambda_U)}{CF_j(\lambda_U)} \right)^2 \quad (2.23)$$

Die absoluten Normalisierungsfaktoren  $\beta_i$  für jedes  $CF_i$  werden durch Aufmultiplikation aller relativen Faktoren vom blauen Ende an erhalten, wobei  $\alpha_1 = 1$ .

$$\beta_i = \prod_{k=1}^i \alpha_k \quad (2.24)$$

Die gesamte Korrekturfunktion  $CF(\lambda_U)$  ist gegeben als gewichtetes Verhältnis aller partiellen Korrekturfunktionen multipliziert mit ihren absoluten Normalisierungsfaktoren.

$$CF(\lambda_U) = \frac{\sum_{i=1}^4 [\beta_i CF_i(\lambda_U) / \sigma_i^2(\lambda_U)]}{\sum_{i=1}^4 [1 / \sigma_i^2(\lambda_U)]} \quad (2.25)$$

Die Varianz  $\sigma_i^2$  für den Farbstoff  $i$  ist:

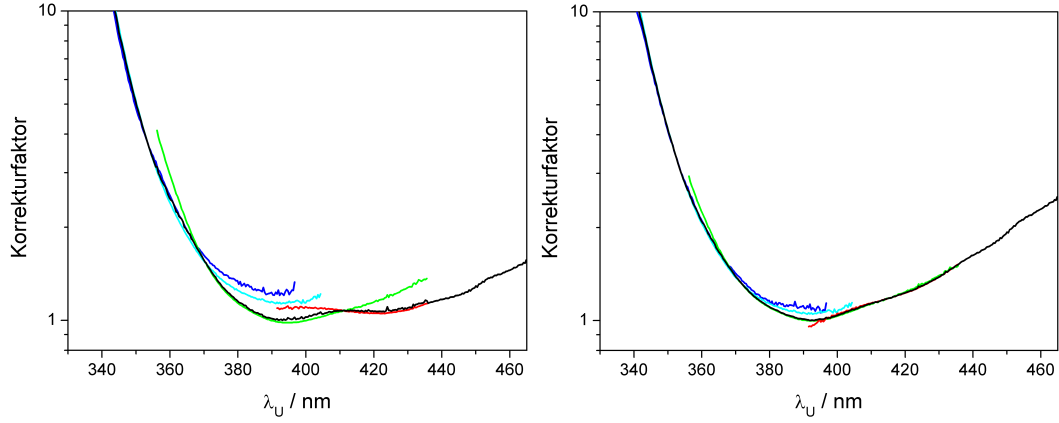
$$\sigma_i^2(\lambda_U) = \frac{(\beta_i C F_i(\lambda_U))^2}{\sigma_i(\lambda_U)} \quad (2.26)$$

Nach Normalisierung auf das Minimum kann die Korrekturfunktion verwendet werden, um technische, zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren zu korrigieren. In Abbildung 2.7 sind die partiellen normierten Korrekturfunktionen  $CF_i(\lambda_U)$  für alle 4 Farbstoffe, sowie die erhaltene Korrekturfunktion  $CF(\lambda_U)$  für eine Beispielkonfiguration gezeigt. Dabei ist deutlich der Einfluss der Gate-Wellenlänge sichtbar. Im Prinzip liefert der TOPAS Pulse zentriert bei  $\lambda_G = 1340$  nm, in der Realität kann dies jedoch abweichen. In dem Beispiel in Abbildung 2.7 ist links die Korrekturfunktion gezeigt, erstellt mit  $\lambda_G = 1340$  nm. In den Überlappungsgebieten der partiellen Korrekturfunktionen sind Abweichungen zu sehen, da die *in silico* aufkonvertierten Referenzspektren  $f_i^{(F)}(\lambda_U)$  falsch verschoben sind. Rechts gezeigt sind die entsprechenden Funktionen aus den gleichen Messungen, berechnet mit  $\lambda_G = 1370$  nm, dargestellt. Es ist also mithilfe der hier dargestellten Methode möglich, die Gate-Wellenlänge zu bestimmen, indem die Abweichungen der partiellen Korrekturfunktionen minimiert werden.

Ebenso ersichtlich ist, dass auch die Steigung der Korrekturfunktion für die beiden unterschiedlichen  $\lambda_G$  deutlich abweicht. Da dieser Schritt vorher nicht durchgeführt wurde, könnten fehlerhaft korrigierte Spektren erhalten worden sein. In dieser Arbeit wurde die Gate-Wellenlänge für alle FLUPS-Messungen auf diesem Weg bestimmt.

Für verschiedene Winkel  $\delta'_{Fcentral}$ , jeweils für Case A und Case B sind Abbildung 2.8 Korrekturfunktionen für das FLUPS-Setup in Berlin und in Abbildung 2.9 für das Setup in Genf dargestellt. Die Setups unterscheiden sich hauptsächlich um die Größe des Eingangswinkels  $|\alpha'_{central}|$  zwischen Fluoreszenz und Gate. In Berlin beträgt dieser  $23^\circ$ , in Genf  $21^\circ$ . Dies äußert sich unter anderem in einer erhöhten Bandbreite für Case A.

Eine qualitative Übereinstimmung zwischen den vorhergesagten und experimentell bestimmten Korrekturfunktion ist gegeben. Generelle Trends in den gemessenen Kurven bei

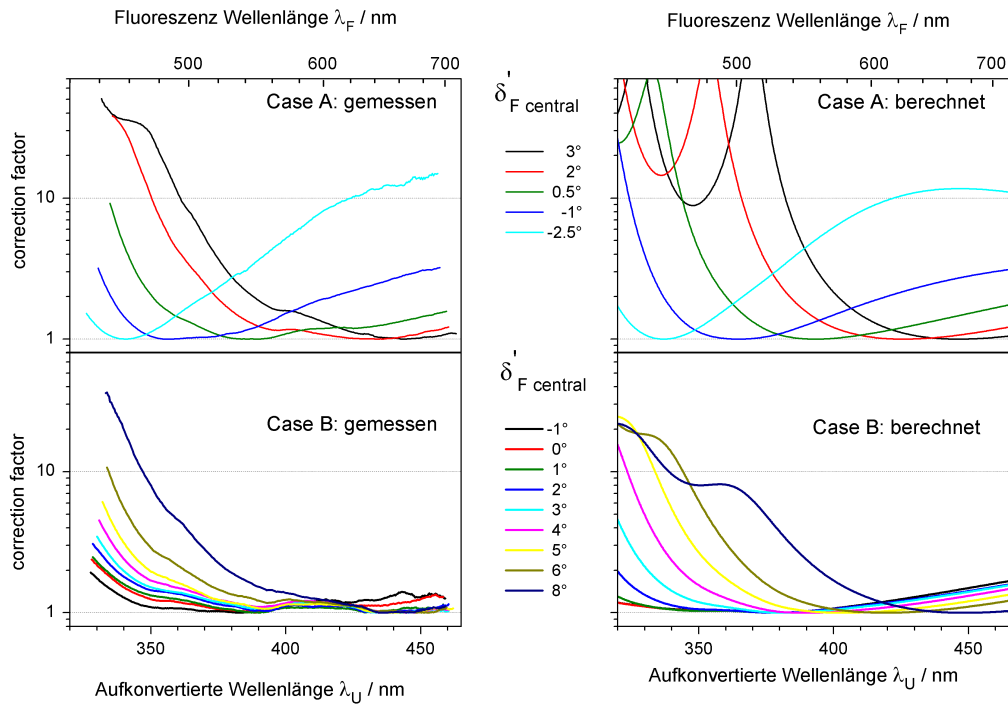


**Abbildung 2.7:** Partielle Korrekturfunktionen  $CF_i(\lambda_U)$  jeweils multipliziert mit den entsprechenden  $\beta_i$  für BBOT (blau), C6H (cyan), C153 (grün) und DCM (rot), sowie die erhaltene Korrekturfunktion  $CF(\lambda_U)$  (schwarz). Dabei wurde für die Berechnung der links gezeigten Kurven  $\lambda_G = 1340$  nm eingesetzt. Rechts für  $\lambda_G = 1370$  nm.

Änderung von  $\delta'_{F_{central}}$ , wie Shifts, eine Rotation um das Minimum und charakteristische Merkmale auf der blauen Seite, werden in den Berechnungen vorhergesagt.

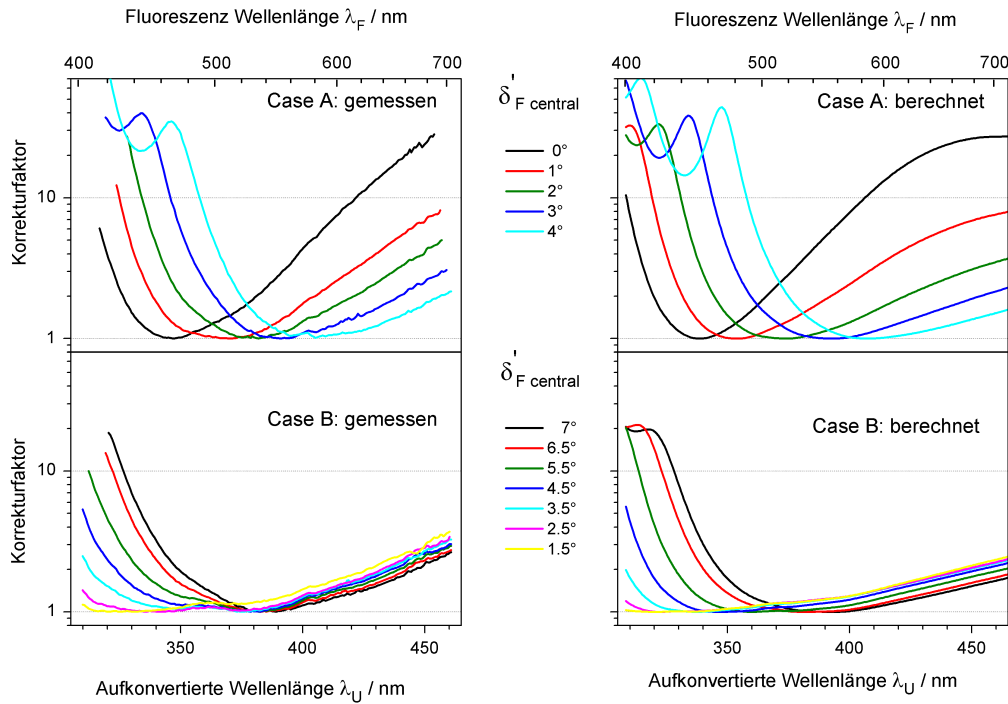
Wie eingangs erwähnt, dient die photometrische Korrektur dazu, die wahren momentanen Fluoreszenzspektren aus den technischen Spektren zu erhalten. Diese wahren Spektren sollten damit nur noch abhängig von der Probe und unabhängig vom System sein, mit welchem sie gemessen wurden. Um das zu testen wurden in Kooperation mit Arnulf Rosspeintner von der Université de Genève transiente Fluoreszenzspektren von C153 in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit zwei verschiedenen Setups gemessen. Nach photometrischer Korrektur sind die Spektren, welche mit dem Setup in Genf und jenem in Berlin gemessen wurden, praktisch identisch, wenn man die Standards von Fluoreszenz-Spektrophotometrie bedenkt.<sup>[64]</sup> Die Spektren für 1 ps und 500 ps nach Anregung sind in Abbildung 2.10 dargestellt. Für das normierte Spektrum bei 1 ps ergaben sich beispielsweise eine Peakwellenzahl  $\tilde{\nu}_0$  von 19380 (19270)  $\text{cm}^{-1}$ , eine Bandenbreite  $\Delta$  von 3680 (3520)  $\text{cm}^{-1}$  und -0.34 (-0.29) als Asymmetrie  $\gamma$  aus Lognormalfits für Berlin (Genf).

Innerhalb dieser Kooperation wurde weiterhin das Lösungsmittelgemisch DMSO/Glycerin



**Abbildung 2.8:** Experimentell bestimmte (links) und vorhergesagte (rechts) photometrische Korrekturfaktoren gegen Wellenlängen der aufkonvertierten Fluoreszenz  $\lambda_U$  für FLUPS-Setup in Berlin mit  $|\alpha'_{central}| = 23^\circ$ . Die Korrekturfunktionen wurden jeweils auf das Minimum normiert.

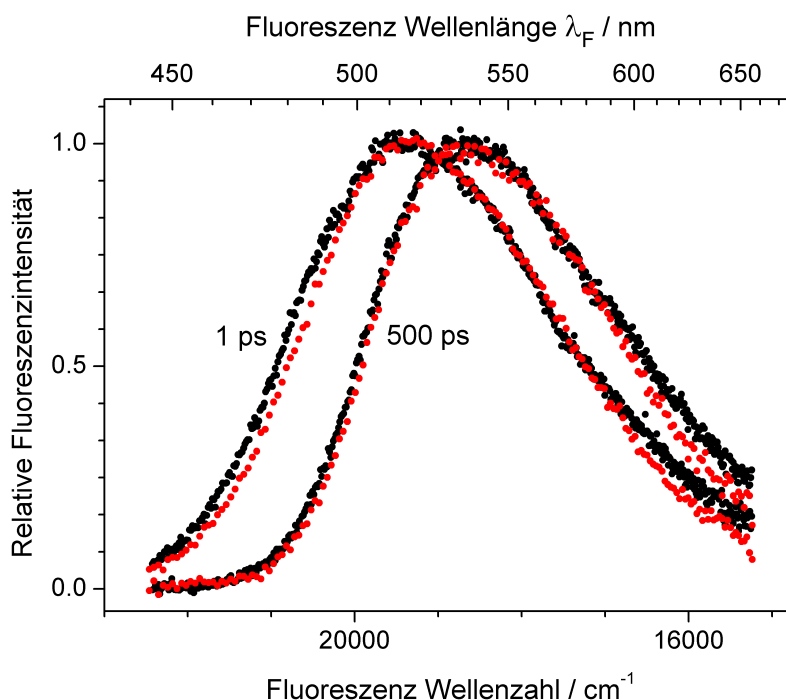
in unterschiedlichen Zusammensetzungen untersucht. Dabei ändert sich nur die Viskosität, nicht aber die dielektrischen Eigenschaften der Mischungen. Um die Reproduzierbarkeit der Messungen der Solvatationsdynamik zu gewährleisten, wurden Lösungen von C153 in beiden Laboren gemessen. <sup>[65]</sup>



**Abbildung 2.9:** Analog zu Abbildung 2.8, aber für das FLUPS-Setup in Genf mit  $|\alpha'_{\text{central}}| = 21^\circ$ . Die Kurven wurden von Arnulf Rosspeintner in Kooperation zu dieser Arbeit exakt äquivalent erstellt.

## 2.4 Beispiele

In diesem Abschnitt sollen Beispiele für Anwendungsgebiete der beiden Mess-Modi Case A und Case B für FLUPS gezeigt werden. Case A besitzt eine hohe Effizienz, aber eine schmalere Bandbreite. Durch den großen Winkel  $|\alpha'_{\text{central}}| = 23^\circ$  ist diese Verschmälerung allerdings nicht so stark wie beispielsweise im Setup von Genf (zu sehen in den Abbildungen 2.8 und 2.9). Weiterhin kann der Kristall für jedes Problem reproduzierbar um seine Tisch-normale Achse gedreht werden, um die Aufkonversionseffizienz auf den gesuchten Wellenlängenbereich zu optimieren. Diese Möglichkeit der Optimierung kann nun durch die verbesserte Prozedur zur Erstellung der photometrische Korrektur verwirklicht werden, sodass Case A breit anwendbar ist. Grenzen stellen große Fluoreszenzshifts und kleine Fluoreszenzwellenlängen nahe der Anregung dar. Für niedrige Wellenlängen sind die entsprechenden photometrischen Korrekturfunktionen sehr steil, sodass hier auf Case



**Abbildung 2.10:** Transiente Fluoreszenzspektren von C153 in DMSO gemessen und korrigiert in Berlin (schwarz) und Genf (rot), jeweils 1 ps und 500 ps nach Anregung. Die Spektren wurden auf die Amplitude eines Fits der Lognormalfunktion normiert.

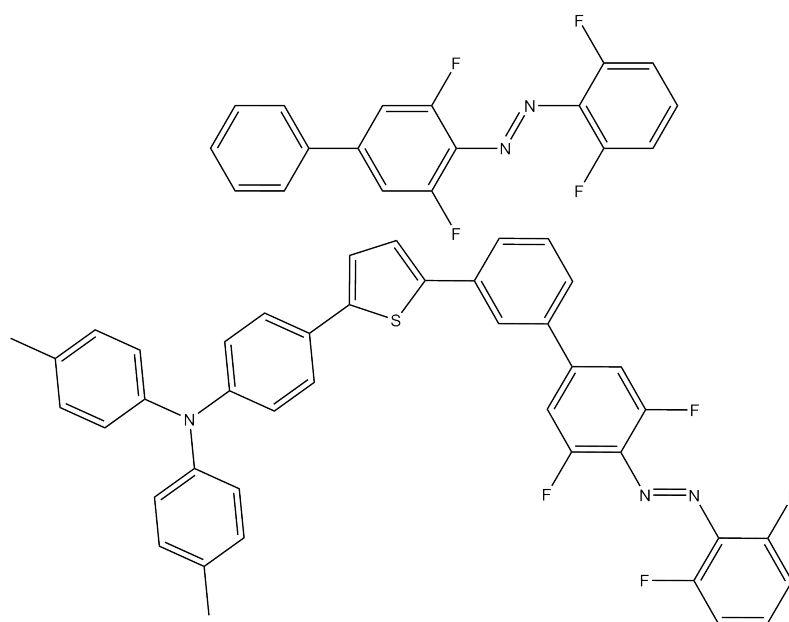
B zurückgegriffen werden muss.

### Azobenzene

Azobenzene zeigt zwar keine messbare stationäre Fluoreszenz, durch fs-zeitaufgelöste Verfahren ist es allerdings möglich, transiente Fluoreszenz zu beobachten.<sup>[66–68]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden transiente Fluoreszenzspektren von *E*-Azobenzenen,<sup>[68]</sup> sowie von bi-stabilen Derivaten (Strukturen in Abbildung 2.11) aufgenommen. Diese Derivate, welche von Javier Moreno aus dem Arbeitskreis Prof. Hecht synthetisiert wurden, können durch Zweiphotonenabsorption angeregt und somit isomerisiert werden.<sup>[69,70]</sup>

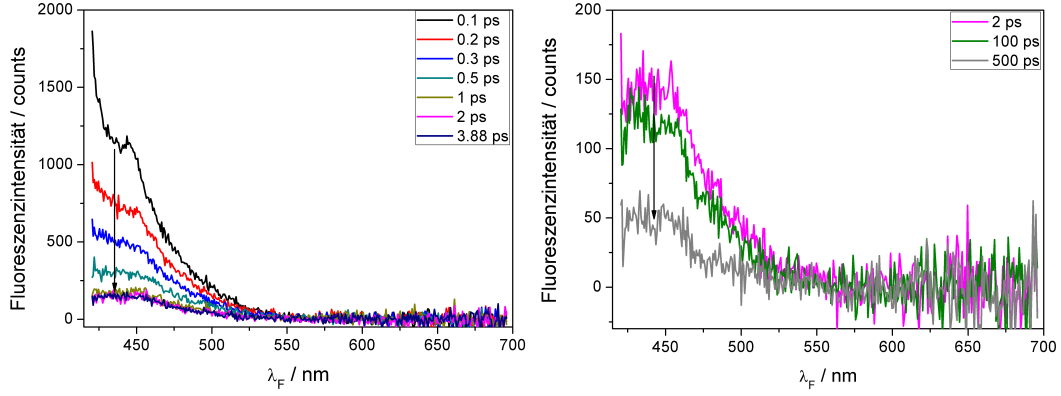
Das in Abbildung 2.11 oben dargestellte Azobenzene A1 zeigte eine kaum detektierbare transiente Fluoreszenz. Durch Einführung der Triphenylamin-Antenne konnte diese je-





**Abbildung 2.11:** Strukturen der bistabilen Azobenzene, welche untersucht wurden. Unten gezeigt ist eine Dyade A2 aus dem oben abgebildeten Azobenzenen A1 und einer Triphenylamin-Antenne.

doch stark erhöht werden. Da A2 in *n*-Hexan bei relativ niedrigen Wellenlängen emittiert, musste das Setup für diese Messung auf Case B eingestellt werden, um zumindest einen Teil der Fluoreszenzbande detektieren zu können. Die Spektren sind in Abbildung 2.12 dargestellt, es zeigte sich dabei ein interessanter zweistufiger Abfall der Fluoreszenzintensität. Um den Abfall der Fluoreszenzintensität zu verdeutlichen, wurde das Bandintegral von 422-530 nm berechnet. Da die Spektren perpendicular zur Polarisation der Anregungspulse detektiert wurden ( $I_{\perp}$ ), musste der Abfall umgerechnet werden zum Signal, detektiert im magischen Winkel ( $I_{ma}$ ). Dies ist möglich ohne den zeitlichen Verlauf der parallel detektierten Fluoreszenz zu kennen, wenn der Anisotropieabfall  $r(t)$  bekannt ist. Für *E*-A2 in *n*-Hexan wurde dieser durch transiente Absorptionsmessungen bestimmt, es ergab sich ein monoexponentieller Abfall mit der Rotationszeit  $\tau_R$ . Es werden die Definitionen der



**Abbildung 2.12:** Transiente Fluoreszenzspektren von *E*-A2 in *n*-Hexan. Die Fluoreszenz sinkt nach der Anregung schnell auf ein Niveau ab (links), von welchem es nur langsam abfällt (rechts). Dieser Abfall ist auch gut in der Kinetik des Bandintegrals zu sehen, siehe Abbildung 2.13.

Anisotropie und des Signals im magischen Winkel verwendet.<sup>[71]</sup>

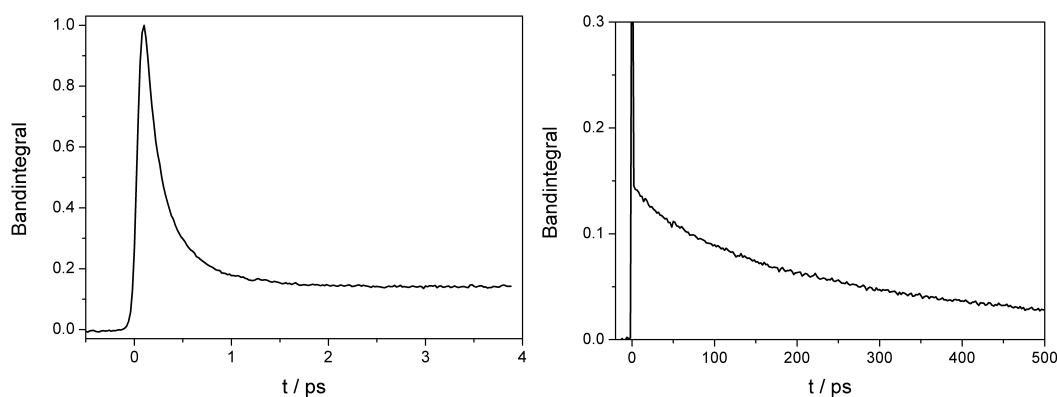
$$r(t) = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = 0.4 \exp(-t/\tau_R) \quad (2.27)$$

$$I_{ma} = \frac{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}{3} \quad (2.28)$$

Wird  $I_{\parallel}$  ersetzt ergibt sich folgender Zusammenhang.

$$I_{ma} = \frac{I_{\perp}}{1 - 0.4 \exp(-t/\tau_R)} \quad (2.29)$$

Der zeitliche Verlauf des Bandintegrals von *E*-A2 in *n*-Hexan ist in Abbildung 2.13 dargestellt. Der schnelle Abfall ist der Isomerisierung des Azobenzens zuzuordnen.<sup>[69,70]</sup> Der langsame Abfall bei langen Verzögerungszeiten entspricht dem der isolierten Antenne, welche ebenfalls gemessen wurde. Verunreinigungen der Probe mit nichtumgesetzter Antenne wurden ausgeschlossen. Eine mögliche Erklärung ist, dass Konformere in der Lösung existieren, bei welchen die Antenne und das Azobenzene komplett elektronisch entkoppelt



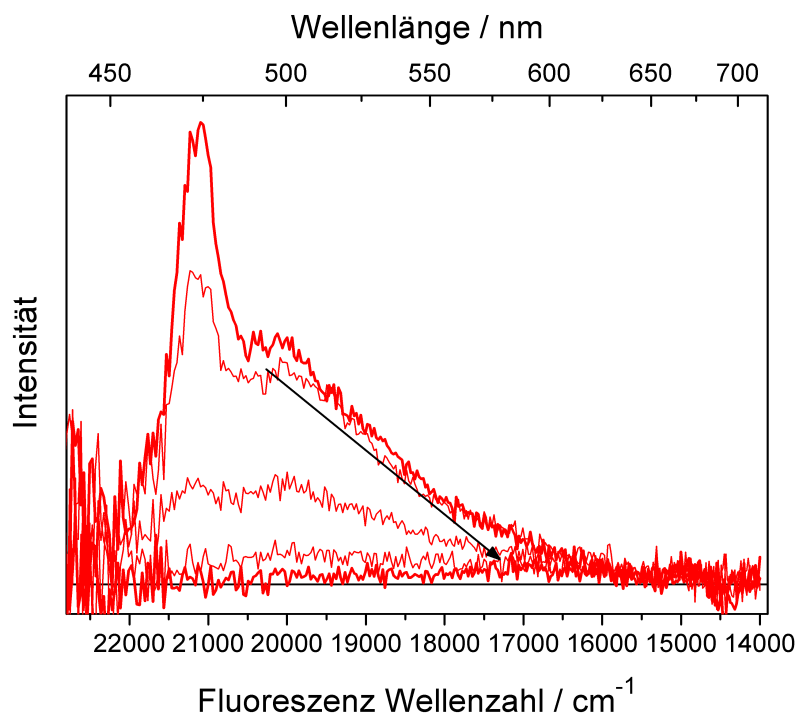
**Abbildung 2.13:** Zeitlicher Verlauf der Bandintegrale (magischer Winkel, 422-530 nm) für *E*-A2 in *n*-Hexan, berechnet nach Gleichung 2.29 für frühe (links) und späte Zeiten nach Anregung (rechts). Die Normierung erfolgte auf das Maximum.

sind. Dadurch würde die Anregungsenergie aus der Antenne nicht an die Azobenzeneinheit übertragen werden. Die Versuche wurden in Acetonitril wiederholt, was zu ähnlichen Ergebnissen führte.

### **[Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>**

Der Komplex Tris(bipyridin)ruthenium(II) zeichnet sich durch einen sehr schnellen Übergang zu einem Triplettzustand nach Anregung in den Singulett-Zustand (*inter system crossing, ISC*) aus. Die Beobachtung dieses Übergangs durch die Verfolgung der Fluoreszenzbande auf einer Femtosekundenzeitskala im Labor von M. Chergui galt als wichtiges Argument für breitbandige fs-Fluoreszenzspektroskopie. Allerdings wurden diese Spektren nicht photometrisch korrigiert mit der Begründung, dass der Anstieg der Korrekturfunktion nur sehr gering ist, ohne diese aber zu zeigen.<sup>[72]</sup>

Dieses System ist ein gutes Beispiel für FLUPS, eingestellt auf Case A, da hier eine moderate Verschiebung (etwa 3000 cm<sup>-1</sup>) einer schwachen Fluoreszenzbande beobachtet wird und die Fluoreszenz auch nicht zu weit im höheren Wellenzahl-Bereich liegt. Abbildung 2.14 zeigt korrigierte Fluoreszenzspektren mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis, bei 16 s Integrationszeit pro Spektrum (4 Mittlungen von Messungen mit je 4 s Integrationszeit).

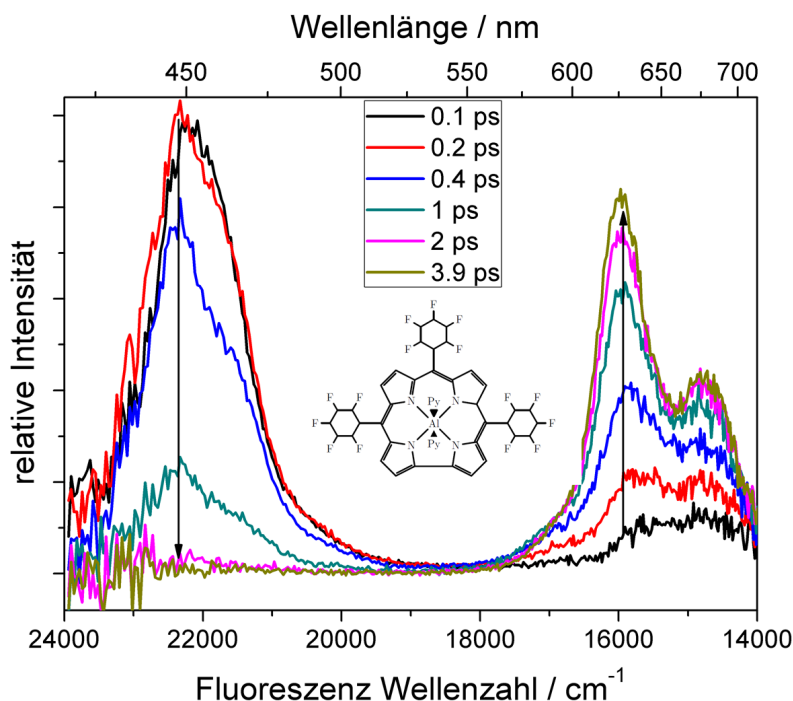


**Abbildung 2.14:** Transiente Fluoreszenzspektren von  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  in wässriger Lösung bei 0, 0.04, 0.08, 0.12 und 0.2 ps nach Anregung. Bei  $\sim 21000 \text{ cm}^{-1}$  ist die Raman-Bande von Wasser zu sehen.

### Corrole

Als Grenzfall für Case A, bei welchem die spektral beobachtbare Breite gerade noch ausreicht, sollen die Corrole aufgeführt werden, welche in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Heyne untersucht wurden. Die Struktur von Aluminium-tris-pentafluorcorrol, sowie dessen transienten Fluoreszenzspektren, gemessen in Toluol sind in Abbildung 2.15 dargestellt.

Hier sind zwei voneinander getrennte Fluoreszenzbanden zu sehen, wobei eine Bande bei etwa 450 nm schnell abklingt, während sich die zweite Fluoreszenzbande bei etwa 650 nm verzögert aufbaut. Da die blaue Bande durch ihre kurze Lebenszeit nicht zum stationären Spektrum beiträgt, ist eine breitbandige Aufnahme mit präziser photometrischer Korrektur notwendig, um die relativen Amplituden bei jeder Wellenlänge zu erhalten. Diese



**Abbildung 2.15:** Transiente Fluoreszenzspektren des Corrols  $[\text{Al}(\text{tpfc})\text{py}_2]$ , gelöst in Toluol.

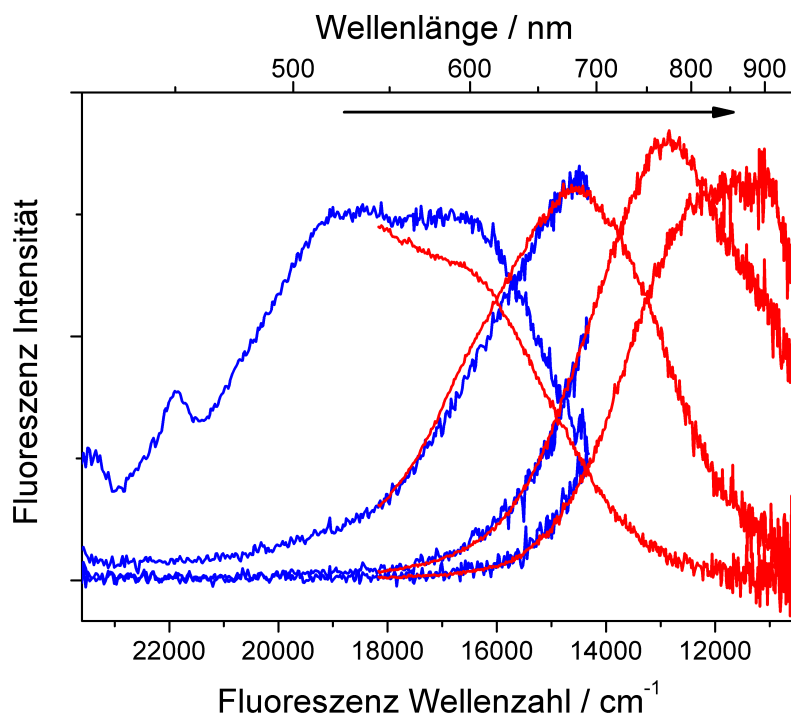
Spektren könnten nicht aus spektraler Rekonstruktion von einzelnen Zeitspuren erhalten werden.

## DANS

*E*-4-Dimethylamino-4'-nitrostilben (DANS) besitzt ein großes Übergangsdipolmoment aufgrund der stark Elektronendichte-schiebenden, beziehungsweise -ziehenden Gruppen. Dadurch ergibt sich in polaren Lösungsmitteln ein sehr großer Stokes-Shift, welcher allerdings noch nicht komplett zeitlich aufgelöst werden konnte. In Acetonitril beträgt dieser beispielsweise etwa  $11000 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>[73]</sup> Da Acetonitril-Moleküle relativ klein sind, findet diese Verschiebung sehr schnell statt. Bisher wurden lediglich rekonstruierte transiente Absorptionsspektren für dieses System veröffentlicht.<sup>[73]</sup> Die stimulierte Emission ist jedoch deutlich überlagert von Absorption angeregter Zustände, sodass auch in dieser Arbeit der zeitabhängige Stokes-Shift nicht zu sehen ist.

Um die spektrale Relaxation aufzulösen, wurde eine Kombination von Case A und Case B verwendet. Zuerst wurde mit Case B ein breites Fenster gemessen, doch die Fluoreszenz verschiebt sich bereits nach kurzer Zeit aus dem beobachtbaren Fenster (blaue Spektren in Abbildung 2.16). Es wurde deshalb das Gitter im Spektrographen gedreht, um einen anderen Wellenlängenbereich auf den Detektor zu dispergieren. Nach erneuter Pixel-Wellenlängen-Kalibrierung konnten transiente Spektren bei niedrigeren Wellenzahlen aufgenommen werden. Da die Anregung außerdem eine Isomerisierung des Stilbens hervorruft, ist die Lebensdauer des angeregten Zustands kurz und die Intensität des Fluoreszenzsignals dadurch bereits nach kurzer Zeit relativ gering. Deshalb wurden diese Spektren mit Case A aufgenommen. Ein Problem stellt in diesem Bereich die photometrische Korrektur dar, da Farbstoffe gemessen werden müssen, die in diesem Bereich nach Anregung bei 400 nm fluoreszieren. Es wurden die Spektren für C153 und DCM aufgenommen, um eine Korrektur bis  $\lambda_F = 705$  nm zu erhalten, der restliche Bereich musste extrapoliert werden. Dazu wurden die vorhergesagten Korrekturfunktionen aus Abschnitt 2.3.1 herangezogen. Diese stimmen zwar nicht quantitativ mit realen Korrekturfunktionen überein, doch es ist zu erkennen, dass die Funktionen im roten bis infraroten Wellenlängenbereich keine Strukturmerkmale aufweisen. Mithilfe einer exponentiellen Extrapolation für die photometrische Korrektur konnten transiente Spektren (rot in Abbildung 2.16) erhalten werden. Da Case A eine deutlich bessere Aufkonversionseffizienz als Case B aufweist, wurden für diese Auftragung die Spektren im „normalen“ Wellenlängenbereich mit einem Faktor von 5 multipliziert.

Im Überlappbereich zwischen den beiden spektralen Bereichen ist gerade für Verzögerungszeiten  $>200$  fs eine gute Übereinstimmung gegeben. Bei 0.08 ps weisen die Banden eine Schulter auf. Grund hierfür ist keine zweite Fluoreszenzbande, sondern die bereits erwähnte Absorption angeregter Zustände. Das wurde bestätigt, indem die Messungen bei verringerter Pumpenergie wiederholt wurden, wie bereits für 4-Dimethylamino-4'-cyanostilben beschrieben wurde.<sup>[74]</sup> Dies könnte auch die Ursache für die Unterschiede zwischen den rot



**Abbildung 2.16:** Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von DANS in Toluol bei 0.08, 0.2, 1 und 2 ps nach Anregung. In blau gezeigt sind Spektren, erhalten mit normalen Einstellungen (Case B). In rot gezeigt sind Spektren, gemessen bei gedrehtem Gitter im Spektrographen mit der Einstellung Case A.

und blau dargestellten Spektren in Abbildung 2.16 bei frühen Zeiten nach Anregung sein, da die Messungen an verschiedenen Tagen mit leicht unterschiedlichen Pumpintensitäten gemessen wurden. Nichtsdestotrotz ist dies die erste breitbandige Darstellung transienter Fluoreszenzspektren dieses Systems. Durch transiente Absorptionsmessungen sollten die Fluoreszenzspektren um den Anteil der Absorption der angeregten Zustände korrigiert werden können.<sup>[74,75]</sup>





## 3 Wasser Solvatationsdynamik um komplexe Matrices

### 3.1 Nukleinsäuren

#### 3.1.1 Literaturüberblick

Nukleinsäuren (*desoxyribonucleic acid*, DNA) sind ein klassisches Beispiel für Untersuchungen der Solvatationsdynamik mittels fs-zeitaufgelöster Fluoreszenz- beziehungsweise Absorptionsspektroskopie in wässrigen Lösungen und es gibt eine Vielzahl von Publikationen auf diesem Gebiet. Grundlegende Unterschiede sind dabei die verwendeten Polaritätssonden. Die natürlichen DNA-Basen eignen sich dafür nicht aufgrund der kurzen Lebenszeit des angeregten Zustandes.<sup>[76]</sup> Der Chromophor kann als Interkalationsfarbstoff<sup>[75,77–81]</sup> oder als Nukleobasenanalogon in den Doppelstrang implementiert sein.<sup>[82–87]</sup> Aktuell wurde gezeigt, dass ebenfalls ein isosteres Basenpaar verwendet werden kann.<sup>[88,89]</sup> Weiterhin wurde die Solvatationsdynamik auch mithilfe von fs 2D-Infrarotspektroskopie diskutiert.<sup>[90–93]</sup>

Zum direkten Vergleich der Relaxationsfunktionen, welche in den Publikationen meist durch exponentielle Funktionen beschrieben sind, wird in dieser Arbeit zusätzlich zu den Zeitkonstanten auch die in Abschnitt 1.2 eingeführte mittlere Solvatationszeit  $\tau_{solu}$  diskutiert. Diese ist ein Maß für den gesamten Verlauf der Solvatationsdynamik und kann dadurch aussagekräftiger als einzelne Zeitkonstanten sein. Da Zeitkonstanten in den meisten Publikationen ohne Fehlerbereiche angegeben werden, sollen hier nur die entsprechenden

Werte verglichen werden.

#### Basensurrogate

Die Vorteile von nukleobasenanalogen Farbstoffe sind die ortsgenaue Bestimmung der Solvatationsdynamik und die Erhaltung der Duplexstruktur. Verwendet wurden 2-Aminopurin (2AP), ein Adenin in einem komplementärem DNA-12mer ersetzend,<sup>[84]</sup> Cumarin 102, das zentrale Basenpaar in einem 17mer ersetzend,<sup>[82,83,85,86]</sup> sowie 2-Hydroxy-7-nitrofluoren (HNF), welches ebenfalls das zentrale Basenpaar in einem DNA-13mer substituiert.<sup>[87]</sup>

2AP-12mer wurde mittels fs Typ-1 Fluoreszenz-Aufkonversionsspektroskopie gemessen,<sup>[84]</sup> die Nachteile von spektraler Rekonstruktion wurden bereits diskutiert (Abschnitt 1.2). Aus dem angegebenen biexponentiellen Abfall (1.6 und 11.6 ps) wurde eine Solvatationszeit von  $\tau_{solv} = 6.6$  ps berechnet. Der Chromophor 2AP ist ungeeignet aufgrund der geringen gesamten Stokes-Verschiebung von  $693 \text{ cm}^{-1}$ , sowie der begrenzten Lebenszeit des angeregten Zustands von 150 ps.

Letzteres stellt ebenfalls das Hauptproblem von HNF-13mer dar, welches mittels transienter Absorption (TA) gemessen wurde. Hier beträgt die Lebensdauer nur 35 ps.<sup>[87]</sup> Aus dem angegebenen triexponentiellen Abfall (0.2, 3.4 und 18.7 ps) ergibt sich  $\tau_{solv} = 5.3$  ps.

Für Cumarin 102 in DNA wurde sehr langsame Solvatationsdynamik beobachtet.<sup>[82,83,85,86]</sup> Als zusammengesetztes Ergebnis aus Messungen mit TA, einer älteren Version des breitbandigen FLUPS-Systems, sowie zeitkorreliertem Einzelphotonenzählen (*time-correlated single photon counting*, TCSPC) wurde ein gesamtes  $S(t)$  erhalten. Dieses wurde nicht exponentiell gefittet, sondern mithilfe eines Exponentengesetzes beschrieben.

$$S(t) = (1 + t/t_0)^{-n} \quad (3.1)$$

Dabei hängt die Dynamik nur von dem Exponenten  $n = 0.15$  ab,  $t_0$  dient lediglich der Erfüllung der Bedingung  $S(t_0) = 1$ .<sup>[85]</sup> Zum besseren Vergleich wurden die Datenpunk-

te anhand der Abbildung 2 dieser Publikation abgetragen und multiexponentiell gefittet (nicht gezeigt). Die Beschreibung durch den Fit ist gerade für längere Verzögerungszeiten relativ schlecht, spezifische Intervalle exponentiellen Abfalls können nicht identifiziert werden. Dies weist darauf hin, dass viele verschiedene Prozesse zur Rotverschiebung der Emissionsbanden beitragen. Die Zeitkonstanten sind 0.05, 2.1, 28.3 und 1228 ps, die mittlere Solvationszeit beträgt  $\tau_{solv} = 154$  ps.

Die Dynamik wurde durch MD-Simulationen reproduziert.<sup>[94]</sup> Die langsamste Komponente wird dabei eingeschlossenen Wassermolekülen in der kleinen Furche und den Gegenionen zugeordnet. Die DNA relaxiert auf einer Zeitskala von etwa 30 ps.

4-Aminophthalimid (4AP)<sup>[95,96]</sup> bildet in Kombination mit 2,4-Diaminopyrimidin (DAP) ein künstliches Basenpaar, das drei Bindungsstellen für Wasserstoffbrückenbindungen bereitstellt. Anhand von NMR-Strukturen wurde jedoch gezeigt, dass ein 13-mer mit dem künstlichen Basenpaar zwei Konfigurationen aufweist mit nur je einer bzw. zwei geschlossenen Wasserstoffbrückenbindungen, aufgrund sterischer Störung.<sup>[88]</sup> Diese Mischung wurde mit FLUPS und TCSPC untersucht. Die beiden erhaltenen Relaxationsfunktionen wurden einzeln gefittet, da die gesamte Stokes-Verschiebung, welche mit TCSPC ermittelt wurde, nur  $135\text{ cm}^{-1}$  betrug. Dies ist gegenüber dem Shift über die kleineren Verzögerungszeiten ( $\sim 1900\text{ cm}^{-1}$ ), welcher mit FLUPS gemessen wurde sehr gering. Es ergaben sich die Zeitkonstanten 0.33, 2.1, 11.7 und 106 ps, sowie 4.9 ns für die Langzeitmessungen. Die mittlere Solvationszeit (berechnet für die Kurzzeitmessung bis 1 ns) beträgt dabei 12.3 ps und würde auch unter Einbeziehung der Langzeitkomponente nicht bedeutend größer werden aufgrund der bereits diskutierten kleinen Amplitude. Die Mischung zweier Konformere macht sich auch in transienten Fluoreszenzspektren bemerkbar. Die Breite der Banden ist zu frühen Zeiten nach Anregung deutlicher größer als die des reinen Farbstoffs 4AP in Wasser. Zu späten Zeiten verschmälern sich die Banden. Dies weist darauf hin, dass das Konformerengemisch sich hauptsächlich kurz nach der Anregung auf die Fluoreszenzbanden auswirkt und somit den TDSS verfälscht.<sup>[88]</sup>

In einer aktuellen Publikation wurde gezeigt, dass dieses künstliche Basenpaar verbessert

werden kann, indem der Chromophor 4AP nicht über die Position 6, sondern stattdessen über die Position 5 glycosidisch an das DNA-Rückgrat gebunden wird. Das entsprechende 13-mer zeigt nur eine NMR-Struktur und eine erhöhte Fluoreszenzquantenausbeute.<sup>[89]</sup> Solvationsmessungen an diesem System wurden allerdings noch nicht durchgeführt.

#### Interkalationsfarbstoffe

Als erster Interkalationsfarbstoff in DNA wurde der Bis(benzimidazol)-Farbstoff Hoechst 33258 (H33258) in einem DNA 12-mer mit Typ-1 Fluoreszenz-Aufkonversion gemessen.<sup>[78]</sup> Der Farbstoff legt sich dabei in die kleine Furche der DNA und bildet Wasserstoffbrücken mit den Nucleobasen. Zeitkonstanten von 1.4 und 19 ps wurden als Fitparameter von  $S(t)$  erhalten, dies entspricht einer mittleren Solvationszeit von  $\tau_{solv} = 7.7$  ps. Die verwendete spektrale Rekonstruktion versagte bei den Spektren in DNA allerdings. Lognormalfits der aus den Zeitspuren erhaltenen Punkte in der spektralen Ebene waren eigentlich nicht mehr zulässig, wie in der entsprechenden Abbildung der Publikation zu sehen ist. Die Zeitkonstanten wurden durch MD-Simulationen bestätigt, wobei die langsamere Komponente DNA-Bewegung zugeschrieben wird.<sup>[97]</sup>

Das System wurde mit FLUPS erneut untersucht.<sup>[75]</sup> Dabei wurde das Problem der zuvor genannten Arbeit offenbart. Die transienten Fluoreszenzspektren sind von Absorption angeregter Zustände überlagert, was durch TA Messungen quantifiziert und entsprechend korrigiert werden konnte. Es wurden Zeitkonstanten von 0.97, 6.61 und 34.8 ps durch einen triexponentiellen Fit der Relaxation erhalten, was einer vergleichbaren mittleren Solvationszeit von  $\tau_{solv} = 8.0$  ps entspricht. Zusätzlich wurde auf der Relaxation eine gedämpfte Schwingung mit einer Frequenz von  $29\text{ cm}^{-1}$  beobachtet, welche mittels MD-Simulationen einer kohärenten Oszillation des Substrat-Ligand-Abstands und einer „Breathing“-Mode der kleinen Furche zugeordnet wurde.

Nachteile von H33258 sind der geringe Stokes-Shift von  $1300\text{ cm}^{-1}$  und die erhebliche Störung der DNA-Struktur, wie durch NMR-Messungen gezeigt wurde.<sup>[75]</sup>

Ein weiterer Interkalationsfarbstoff, welcher als Polaritätssonde verwendet wird, ist 4',6-

Diamidin-2-phenylindol (DAPI), welcher mit Typ-1 Fluoreszenz-Aufkonversion in Verbindung mit TCSPC gemessen wurde.<sup>[79–81]</sup> Abhängig vom Gegenion und DNA-Strang wurde der erhaltene TDSS nur mit einem Exponentengesetz (Gleichung 3.1) oder mit einer zusätzlichen biexponentiellen Funktion gefittet. Die erhaltenen Exponenten  $n \sim 0.15 - 0.2$  reproduzieren die Ergebnisse von Andreatta *et al.*<sup>[85,86]</sup> Der Shift auf längeren Zeitskalen ( $>100$  ps), welcher diskutiert wird, beträgt dabei nur etwa  $200 \text{ cm}^{-1}$ . Strukturelle Informationen sind nicht für alle gemessenen DAPI-DNA Systeme verfügbar. Aus der einzigen Darstellung diesbezüglich<sup>[81]</sup> ist allerdings ersichtlich, dass die Duplexstruktur durch die Interkalation wie bei H33258 lokal stark verändert ist.

Eine frühere Arbeit soll noch erwähnt werden, bei der der Chromophor 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin an eine abasische Stelle der DNA über eine Alkylkette gekoppelt wurde.<sup>[77]</sup> In den transienten Absorptionsspektren ab 200 fs (entspricht der Zeitauflösung) wurde reproduzierbar nur ein stationäres Spektrum und keine Verschiebung beobachtet. Eine zufriedenstellende Erklärung wurde allerdings nicht gefunden.

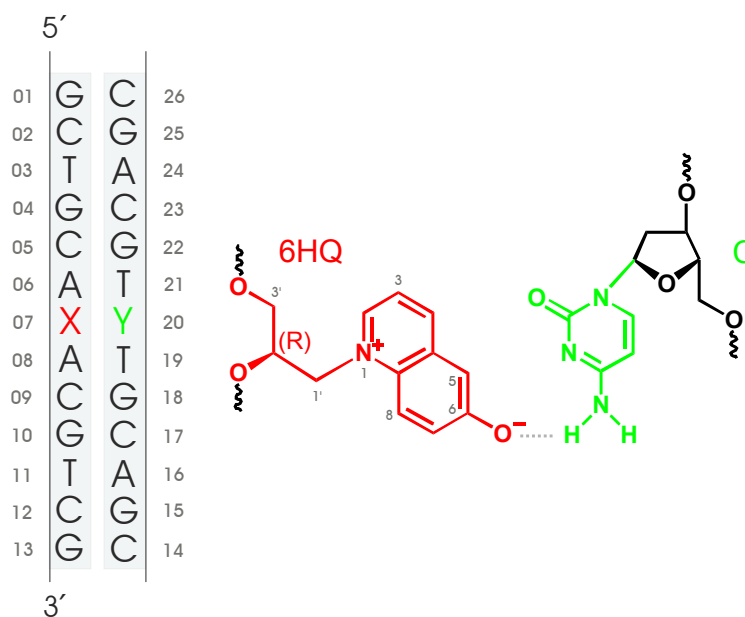
## 2D-Infrarotspektroskopie

Die Solvatationsdynamik um DNA wurde auch mithilfe von 2D-Infrarotspektroskopie untersucht.<sup>[92,93]</sup> Ein Vorteil ist hier, dass als Sonde zum Beispiel eine P-O-Streckschwingung verwendet kann und die DNA nicht durch künstliche Basen oder Interkalationsfarbstoffe markiert werden muss. Allerdings kann aufgrund der Absorption von Wasser im IR-Bereich nicht in Lösung gemessen werden. Die Gegenionen werden ausgetauscht durch große Tenside wie Cetyltrimethylammoniumchlorid, in deren Matrix die DNA befeuchtet und gemessen wird. Eine Einschränkung ist außerdem das beobachtbare Zeitfenster. Die Lebensdauer der symmetrischen P-O-Streckschwingung beträgt 1.24 ps, die der asymmetrischen P-O-Streckschwingung nur 340 fs, sodass langsamere Prozesse nicht verfolgt werden können. In einer aktuellen Arbeit wurde ein biexponentieller Fit des sich ergebenden  $S(t)$  angegeben mit den Zeitkonstanten 300 fs und  $> 10$  ps (da nicht aufgelöst).<sup>[93]</sup> Eine Solvatationszeit kann für diesen Fall daher nur abgeschätzt werden,  $\tau_{\text{solv}} \sim 1$  ps.

In einer aktuellen MD-Studie wurde ein DNA-12mer in wässriger Umgebung simuliert.<sup>[98]</sup> Es wurde gezeigt, dass die P-O-Streckschwingung sensibel auf Hydratationswasser, nicht aber auf gebundenes Wasser in der kleinen oder großen Furche oder auf Gegenionen ist. Somit wäre selbst bei einer längeren beobachtbaren Zeitskala und natürlicherer Umgebung keine langsamere Umgebungsdynamik mit dieser Methode nachzuweisen. Auch in jener Arbeit wurde ein  $S(t)$  ermittelt. Ein triexponentieller Fit ergab Zeitkonstanten 0.05, 1.2 und 7.1 ps. Da die Amplituden zu diesen Zeitkonstanten nicht angegeben wurden, wurde der Verlauf von  $S(t)$  abgetragen und erneut gefittet, mit den angegebenen Zeitkonstanten als feste Parameter. Die Integration ergab eine mittlere Solvatationszeit von  $\tau_{solv} = 0.7$  ps. Die Abbildung, von welcher der Verlauf von  $S(t)$  abgetragen wurde, erfasst weiterhin nur 10 ps, obwohl die berechneten Trajektorien mehrere Nanosekunden lang sind. Ob langsamere Solvatationsdynamik in diesen MD-Rechnungen erfasst wurde, geht nicht aus dieser Publikation hervor.

#### **Zusammenfassung zum Stand der Wissenschaft**

Es ergibt sich folgendes Gesamtbild. Mithilfe von fs-zeitaufgelöster Spektroskopie ergaben sich für Fits von  $S(t)$  drei Zeitkonstanten:  $<1$  ps, 2 – 7 ps und 12 – 35 ps, wobei je nach Zeitauflösung die zwei schnelleren Komponenten zu einer Zeitkonstante von 1 – 2 ps zusammengefasst wurden, oder langsamere Prozesse nicht mehr erfasst werden konnten. Durch MD-Simulationen konnten die schnellen Zeitkonstanten dabei Wassermolekülen nahe der DNA und die langsamere Komponente DNA-Bewegung zugeschrieben werden. Für einige Systeme wurde mithilfe spektraler Rekonstruktion von TCSPC-Zeitspuren eine Verschiebung auf einer längeren Zeitskala von 100 ps – 5 ns beobachtet, welcher aber im Vergleich zu den schnellen Komponenten spektral relativ klein ist. Diese langsame Komponente wurde mittels MD-Studien der Relaxation von Gegenionen und eingeschlossenen Wassermolekülen in den Furchen der DNA zugeordnet. Betrachtet man nicht nur die Zeitkonstanten, sondern auch deren Amplituden, ergeben sich als charakteristische Zahl für die gesamte Relaxation mittlere Solvatationszeiten von etwa  $\tau_{solv} \sim 6 - 12$  ps für alle Sonden mit



**Abbildung 3.1:** Struktur des DNA-13mers 13mer6HQ (links) mit dem Chromophor 6HQ (X, rot), verknüpft über einen Glycerinlinker und der gegenüberliegenden Base Cytosin (Y, grün).<sup>[99]</sup>

ausreichender Lebenszeit. Allerdings zeigten sich Nachteile für alle gemessene Systeme.

### 3.1.2 13mer6HQ

In dieser Arbeit wurde das neue System 13mer6HQ untersucht. Dies ist ein DNA 13mer-Doppelstrang, wobei an der mittleren Position ein Guanin gegen den Chromophor 6-Oxychinoliniumbetain Q getauscht wurde, welcher über einen R-Glycerinlinker an das Phosphatrückgrat des Stranges geknüpft wurde. Es handelt sich bis auf das mittlere Basenpaar um das gleiche 13-mer, welches auch für die Untersuchungen mit dem Basenanalogen HNF<sup>[87]</sup> und dem künstlichen Basenpaar 4AP:DAP<sup>[88,89]</sup> verwendet wurde. Die Struktur ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Polaritätssonde bildet dabei eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem gegenüberliegenden Cytosin.

#### Vorarbeit an 13mer6HQ

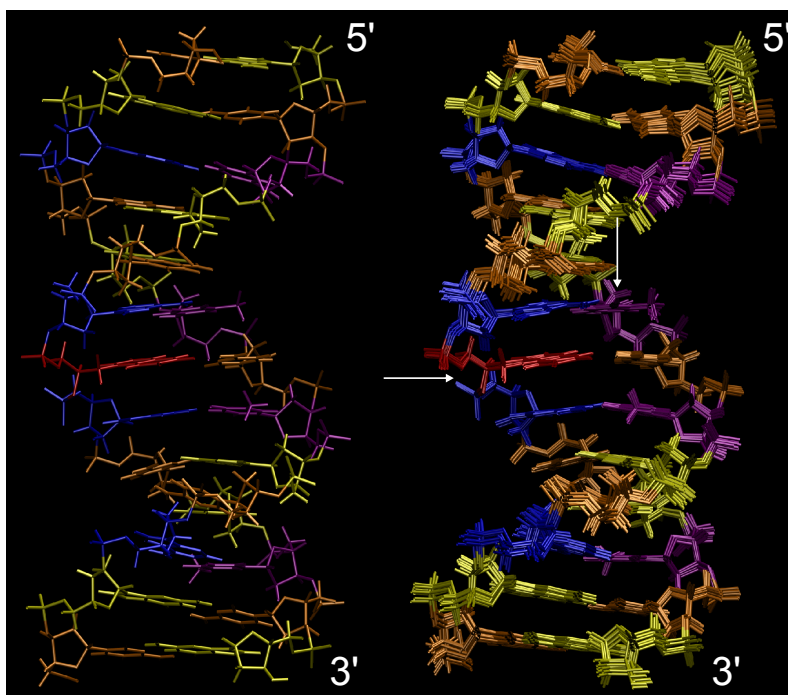
Die Synthese des Stranges erfolgte durch Felix Hövelmann im Arbeitskreis von Prof. Seitz unterstützt durch die Firma *Noxxon Pharma AG*.<sup>[100]</sup> Lars Dehmel konnte die Struktur des Doppelstranges bestimmen, welche in Abbildung 3.2 links abgebildet ist.<sup>[99]</sup> Dafür wurden die Abstände der Wasserstoffatome mithilfe des gemessenen Kern-Overhauser-Effekt-NMR-Spektrums bestimmt. Diese gingen als Grenzparameter in MD-Simulationen des Doppelstrangs ein, bei denen die DNA von 20000 K auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Von 100 erhalten Strukturen, wurden die zehn Strukturen mit niedrigster Energie (Abbildung 3.2 rechts) gemittelt. Es zeigt sich, dass der Doppelstrang eine gute helikale Struktur, ähnlich der natürlichen B-DNA-Struktur, bildet und es werden keine weiteren Konformere beobachtet. Wegen des im Vergleich zur Desoxyribose relativ kleinen Glycerinlinkers entspricht allerdings die Stapel-Achse der Nucleobasen nicht der helikalen Achse, wie es in natürlicher B-DNA der Fall ist.

Der Schmelzpunkt wurde ebenfalls von Lars Dehmel mit einem neuen Verfahren für den Farbstoff und die DNA einzeln bestimmt.<sup>[99]</sup> Dabei wurden die gesamten temperaturabhängigen Absorptionsspektren (Abbildung 3.3) mittels Singularwert-Dekomposition (SVD) analysiert. Für die DNA (bei etwa 260 nm) ergab sich ein Schmelzpunkt von 53 °C, was einer Destabilisierung von 14 K gegenüber dem Referenzstrang mit einem Adenin-Thymin-Paar in zentraler Position bei gleicher Konzentration darstellt. Da die schwindende Wasserstoffbrücke während des Schmelzens die deprotonierte Form freigibt und dessen Bande im sichtbaren Wellenlängenbereich ebenfalls ansteigt, konnte für den Chromophor dasselbe Schmelzverhalten beobachtet werden. Allerdings ergab sich, wie in Abbildung 3.3 bei 100-facher Vergrößerung zu sehen, zusätzlich eine sinkende Komponente für diese Bande. Dies entspricht dem Verhalten des entsprechenden Einzelstrangs, eine mikroskopische Erklärung steht aber noch aus.

#### Stationäre Spektren

Der Doppelstrang wurde in wässrigem Puffer ( $pH = 9$ ) gelöst, sodass die Konzentration 2.3 mM betrug. Zuerst soll das Absorptionsspektrum dieser Probe diskutiert werden, sie-

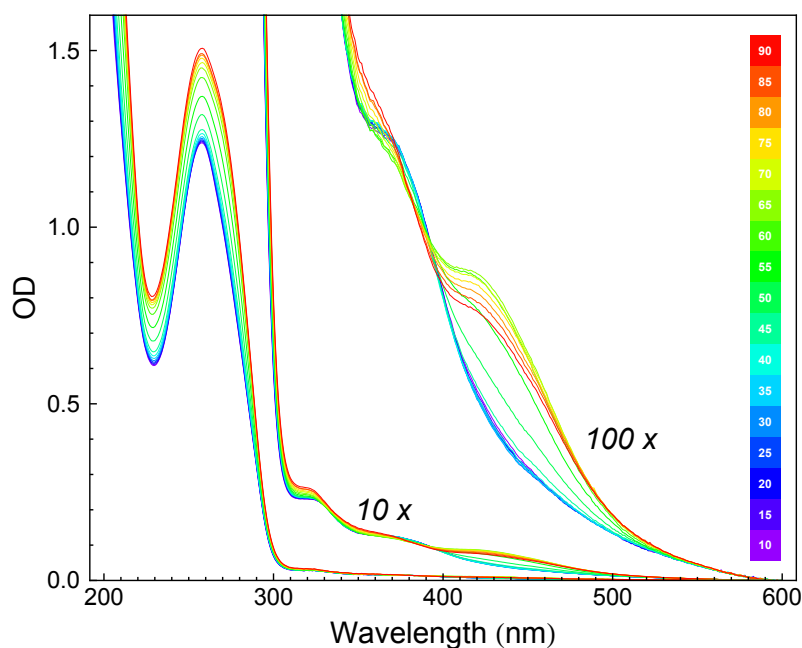




**Abbildung 3.2:** Links: Struktur von 13mer6HQ aus NMR-Messungen von Lars Dehmel. Die künstliche Base 6HQ ist dabei in rot gezeigt, die Farben für Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin sind blau, gelb, orange und violett. Rechts sind die zehn Strukturen gezeigt, aus welchen die Struktur links gemittelt wurde.<sup>[99]</sup>

he Abbildung 3.4, links. Zusätzlich wurden in dieser Abbildung rechts skalierte Spektren des methylierten Chromophors (MQ) in wässriger Lösung, jeweils protoniert (grün) und deprotoniert (schwarz) dargestellt. Es ist erkennbar, dass das sichtbare Absorptionsspektrum von 13mer6HQ Anteile beider Spezies enthält. Da nur eine Struktur in den NMR-Experimenten gefunden wurde,<sup>[99]</sup> ist dieses bimodale Verhalten auf die relativ schwache Wasserstoffbrücke zum Cytosin zurückzuführen. Die Anregung aller Fluoreszenzexperimente in dieser Arbeit erfolgte bei 400 nm. Bei dieser Wellenlänge werden also hauptsächlich deprotonierte Spezies angeregt.

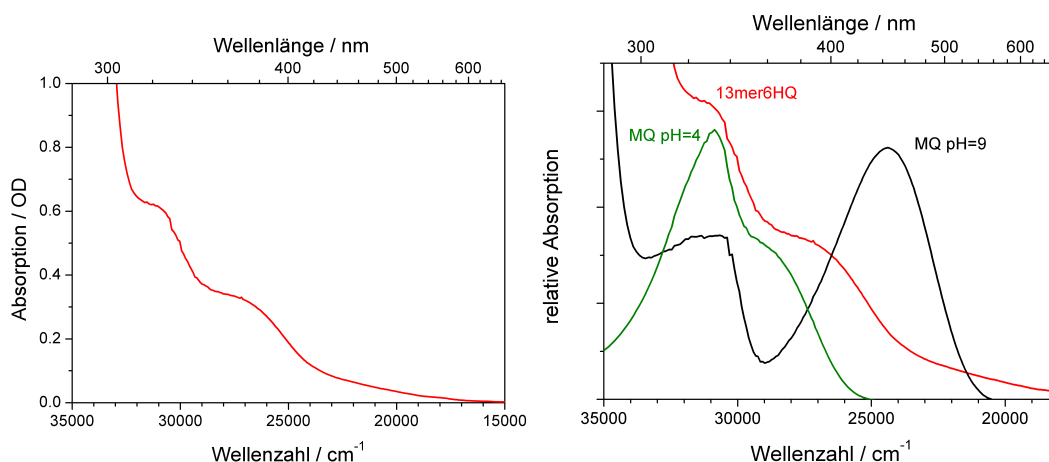
Interessant ist das stationäre Fluoreszenzspektrum von 13mer6HQ, Abbildung 3.5. Wie



**Abbildung 3.3:** Temperaturabhängige Absorptionsspektren von 13mer6HQ von 10 °C (violett) bis 90 °C (rot).<sup>[99]</sup>

bereits von Perez-Lustres *et al.* berichtet, zeigt der Chromphor MQ in saurer wässriger Lösung einen lichtinduzierten Protonentransfer zum Lösungsmittel,<sup>[26]</sup> sodass bei Anregung des protonierten MQ ausschließlich das Emissionsspektrum der deprotonierten Form (Z-Bande) beobachtet wird. Im Fluoreszenzspektrum von 13mer6HQ, zeigen sich mehrere Banden. Die Bande der deprotonierten Spezies (Z-Bande) bei  $\sim 17100\text{ cm}^{-1}$  ist im Vergleich zum Spektrum von MQ (schwarz) leicht blauverschoben und verbreitert. Die zusätzlichen Banden bei etwa  $22000$  und  $21000\text{ cm}^{-1}$ , welche in dieser Auftragung die gleiche Intensität wie die Z-Bande haben, sind beide relativ schmal. Die gemessene Struktur erinnert an die  $S_1$ -Absorptionsbande des protonierten MQ (siehe Abbildung 3.4). Ihre Position legt nahe, dass es sich um die Emission von protonierten Chromophoren handelt, welche zusätzlich angeregt werden.

Im aprotischen Lösungsmittel Acetonitril, bei welchem kein Protonentransfer stattfindet, trat die Fluoreszenzbande des protonierten MQ (C-Bande) in etwa dem gleichen Wellen-



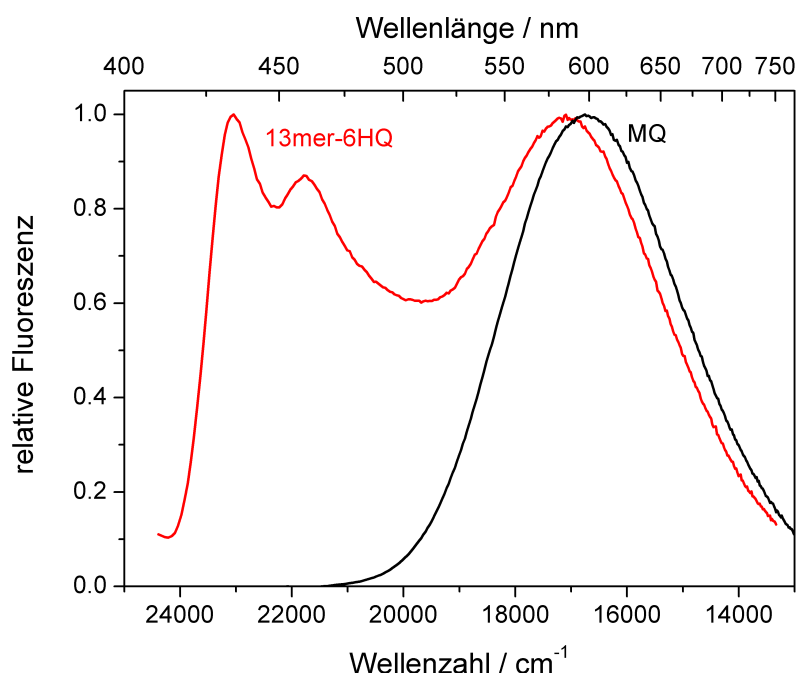
**Abbildung 3.4:** Absorptionsspektrum der Probe 13mer6HQ bei  $pH = 9$  (rot). Zum Vergleich sind rechts skalierte Spektren der deprotonierten Form von MQ bei  $pH = 9$  (schwarz) und der protonierten Form bei  $pH = 4$  (grün) gezeigt. 13mer6HQ enthält also sowohl protonierte, wie auch deprotonierte Anteile des Chromophors Q.

zahlbereich auf.<sup>[26]</sup> Die C-Bande wurde ebenfalls in transienten Absorptionsspektren von MQ bei  $pH = 4$  in dieser Region beobachtet (siehe z.B. Quelle 26 oder Abschnitt 3.3 dieser Arbeit). In beiden Fällen war allerdings keine Struktur auf der C-Bande vorhanden.

Zu erwähnen ist, dass durch die relativ hohe Konzentration der Probe (Bedingung für die FLUPS-Messungen) ein Teil der C-Bande durch die deprotonierte Form reabsorbiert wird. Bei  $23000\text{ cm}^{-1}$  beträgt die Absorption noch 0.14, was einer Abschwächung von 28% entspricht.

### FLUPS-Messungen

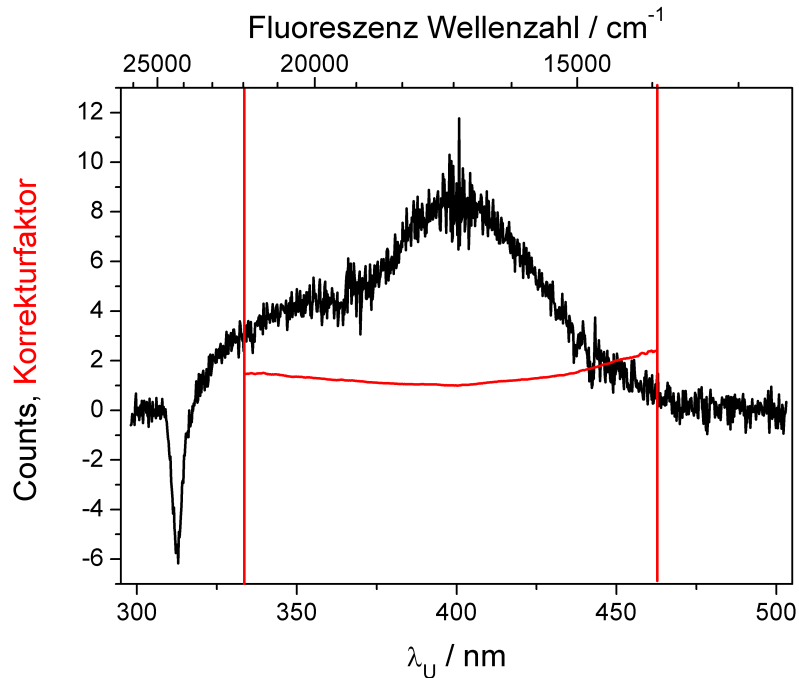
Die beschriebene Probe wurde zur Untersuchung der Solvations- beziehungsweise Umgebungsdynamik mit FLUPS gemessen. Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, beträgt die Konzentration  $2.3\text{ mM}$ . Davon liegt ein geringer Teil deprotoniert vor, sodass die Absorption bei  $400\text{ nm}$  in der  $0.4\text{ mm}$  starken Zelle nur  $0.06$  beträgt. Deshalb wurde zusätzlich zu längerer Integrationszeit ( $3\text{ s}$  pro Spektrum) und höherer Pumpenergie ( $1.6\text{ }\mu\text{J}$ ) ein  $500\text{ }\mu\text{m}$  dicker BBO-Kristall zur SFG verwendet. Dies verschlechtert die Zeitauflösung auf etwa



**Abbildung 3.5:** Fluoreszenzspektrum von 13mer6HQ in wässriger Pufferlösung  $pH = 9$  (rot), nach Anregung bei 400 nm. Zum Vergleich ist das Spektrum von MQ (schwarz) gezeigt. Die Struktur auf der Bande im blauen Wellenzahlbereich wurde bisher für kein anderes MQ-Derivat beobachtet.

200-250 fs.

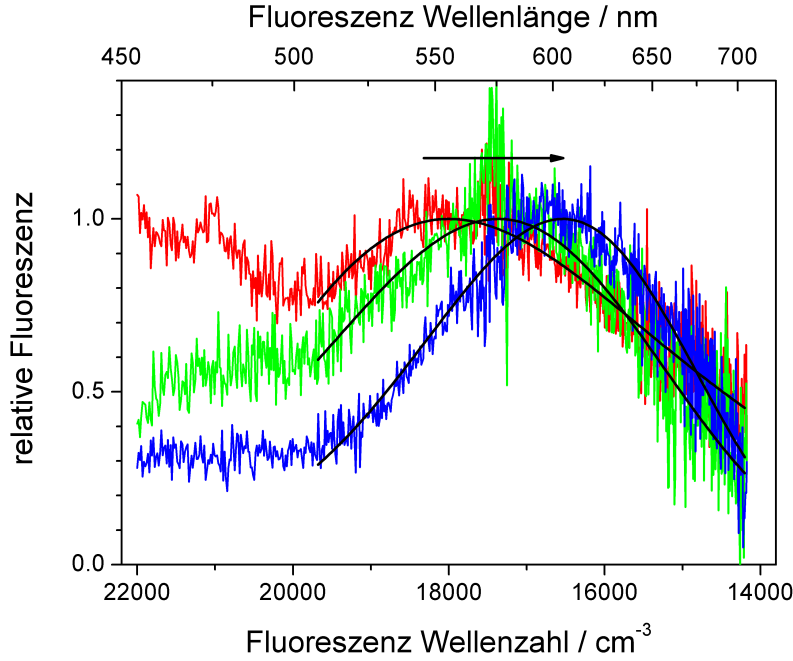
Die zu untersuchende Z-Bande wird von vier Störungsquellen überlagert. Dies wird in Abbildung 3.6 gezeigt, wo das (gemittelte) technische Spektrum bei 2 ps nach Anregung dargestellt ist, wie es mit dem Spektrograph aufgenommen wurde. Da auf Filtern der Probe verzichtet und noch mit dem Filter GG420 gearbeitet wurde, ist starke Streuung des Anregungslichts zu beobachten. Das nicht-aufkonvertierte Pumplicht ist bei 400 nm zu sehen, das aufkonvertierte Pumplicht bei 313 nm. Letzteres besitzt eine sehr hohe Intensität, sodass zu kleinen Verzögerungszeiten das gesamte Spektrum überlagert wird. Es erscheint in Abbildung 3.6 negativ, da es bereits im bei -3 ps aufgenommenen Hintergrund vorhanden ist. Hinzu kommen die dritte Harmonische des Gate-Strahls, welche als Rauschen bei etwa 440 nm zu sehen ist. Die bereits in den stationären Spektren beobachtete



**Abbildung 3.6:** Schwarz: Technisches, aufkonvertiertes Fluoreszenzspektrum von 13mer6HQ, 2 ps nach Anregung, Mittelung von 16 Messungen (je 3 s Integration). Die Z-Bande wird überlagert durch Pumplicht – aufkonvertiert (313 nm) und direkt gestreut (400 nm), die C-Bande des Chromophors (~320-360 nm) und der dritten Harmonischen des Gates (440 nm). In rot ist die photometrische Korrekturfunktion gezeigt und das Fenster in welchem jene aufgenommen wurde.

C-Bande des protonierten Chromophors ist ebenfalls vorhanden, was daran zu erkennen ist, dass das Signal zwischen 320-370 nm nicht verschwindet. Eine etwaige Struktur auf dieser Bande konnte nicht aufgelöst werden.

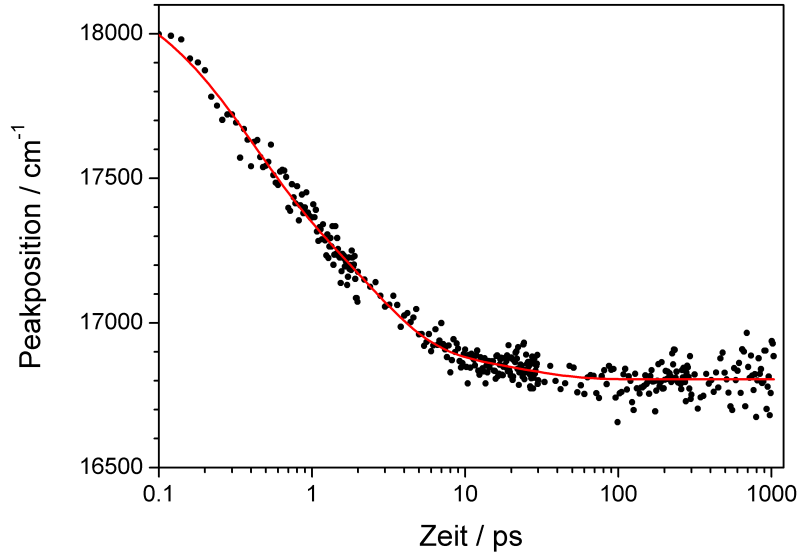
Die zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren nach photometrischer Korrektur sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Um die Z-Bande mittels Lognormalfit zu extrahieren, mussten die vier genannten Störquellen beachtet werden. Das nichtaufkonvertierte Pumplicht und die C-Bande werden im höheren Wellenzahlbereich detektiert. Zu längeren Verzögerungszeiten, wenn die Z-Bande bereits zu kleineren Wellenzahlen verschoben ist, überlagern diese nur schwach, Spektren vor 100 fs wurden verworfen. Weiterhin wurden Daten  $> 19700 \text{ cm}^{-1}$



**Abbildung 3.7:** Zeitaufgelöste, korrigierte Fluoreszenzspektren von 13mer6HQ bei 0.1 ps (rot), 1 ps (grün) und 102 ps (blau) nach Anregung. In schwarz jeweils die Lognormal-Fits der Z-Banden.

für den Fit nicht betrachtet, sodass die C-Bande nur minimal überlappt. Das nicht-aufkonvertierte Pumplicht, sowie die dritte Harmonische des Gates wurde durch zusätzliche Gauß-Terme im Fit beschrieben. Dazu wurde zuerst aus jeder Messreihe ein Spektrum frei gefittet, in welchem die Störungen besonders stark ausgeprägt waren. Die Positionen der Gauß-Terme wurden für die Fits der gesamten Messreihe festgehalten, da beide Überlagerungen durch Laserlicht relativ konstanter Wellenzahl hervorgerufen wurden. Erhaltene Lognormal-Funktionen sind beispielhaft in Abbildung 3.7 gezeigt.

Trägt man nun die aus den Lognormal-Fits erhaltenen Peakpositionen gegen die Zeit auf, erhält man den in Abbildung 3.8 gezeigten Verlauf des zeitabhängigen Stokes-Shifts (TDSS)  $\tilde{\nu}(t)$ . Er wurde mit einem triexponentiellen Fit beschrieben, die Parameter sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Streuung der Werte ist relativ hoch, das quadratische Mittel der Fitresiduen (*root mean square deviation*, *RMSD*) beträgt  $38 \text{ cm}^{-1}$ . Gerade zu



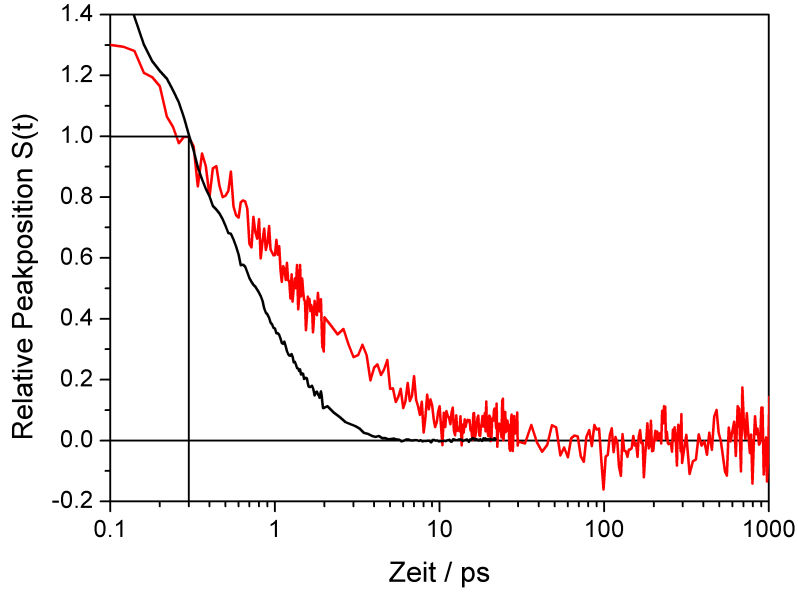
**Abbildung 3.8:** Zeitlicher Verlauf der Peakposition der Z-Bande (Punkte) und triexponentieller Fit (Linie) von 13mer6HQ.

späten Zeiten nach Anregung sind die Abweichungen teilweise sehr groß. Grund ist hier, dass die Fluoreszenzintensität mit zunehmender Verzögerungszeit abnimmt und daher die Bestimmung des Peakmaximums immer ungenauer wird. Dies äußert sich auch in einer hohen Unsicherheit der langen Zeitkonstante. Die mittlere Solvatationszeit  $\tau_{solv}$  wurde nach Gleichung 1.4 auf  $2.8 \pm 0.2$  ps bestimmt, damit entspricht der Fehlerbereich etwa der Zeitauflösung.

Zum direkten Vergleich der für 13mer6HQ bestimmten Umgebungsdynamik zur Solvatationsdynamik von Bulk-Wasser wurde zunächst aus  $\tilde{\nu}(t)$  die normierte Relaxationsfunktion  $S(t)$  bestimmt. Dies erfolgte äquivalent zu Gleichung 1.3, allerdings wurden die Grenzen  $t_0 = 0.3$  ps und  $t_\infty = 1000$  ps gewählt.

$$S(t) = \frac{\tilde{\nu}(t) - \tilde{\nu}(1000 \text{ ps})}{\tilde{\nu}(0.3 \text{ ps}) - \tilde{\nu}(1000 \text{ ps})} \quad (3.2)$$

Durch die Wahl der unteren Grenze können intramolekulare Relaxationsprozesse des Chromophors vollständig ausgeschlossen,<sup>[28]</sup> und die erwähnten Störungen durch das aufkonver-



**Abbildung 3.9:** Zeitlicher Verlauf des bei 0.3 und 1000 ps normierten Stokes-Shifts  $S(t)$  der Z-Bande von 13mer6HQ (rot) im Vergleich zu MQ in Wasser bei  $pH = 9$  (schwarz).

tierte Pumplichts umgangen werden. Die obere Grenze wurde aufgrund des beobachtbaren Zeitfensters von 1 ns gewählt. Die Peakpositionen  $\tilde{\nu}(0.3 \text{ ps})$  und  $\tilde{\nu}(1000 \text{ ps})$  wurden dem Fit entnommen, um Abweichungen einzelner Messwerte nicht in das gesamte  $S(t)$  zu übertragen. Der Verlauf ist in Abbildung 3.9 dargestellt, zusammen mit Präzisionsmessungen für MQ (siehe Abschnitt 3.4.3). Es ist eine deutliche Verzögerung der Dynamik zu erkennen, welche auf Relaxation der DNA, der Gegenionen und gebundene Wassermoleküle zurückzuführen ist. Gerade im Hinblick auf die Ergebnisse für das künstliche Basenpaar 4AP-DAP<sup>[88]</sup> ist es interessant ebenfalls den zeitlichen Verlauf der Halbwertsbreite  $\Delta(t)$  der Fluoreszenzspektren zu betrachten, welcher direkt aus den Lognormalfits zugänglich ist. Die Z-Bande wird mit zunehmender Verzögerungszeit schmaler, wie in Abbildung 3.10 dargestellt ist. Sie zeigt dabei jedoch kein so ausgeprägtes Verschmälungsverhalten zu frühen Zeiten, wie für 4AP-DAP beschrieben. Dies ist konsistent mit der Erkenntnis aus NMR-Strukturen, dass 13mer6HQ keine Mischung zweier Konformere ist. In diesen NMR-Strukturen werden allerdings keine Gegenionen oder Wassermoleküle beachtet, sodass die Verschmälung auf eine Relaxation, besser Homogenisierung dieser hindeuten könnte. Da



**Tabelle 3.1:** Fitparameter für triexponentielle Fits von  $\tilde{\nu}(t)$  und  $\Delta(t)$ . Die Fehlerbereiche wurden direkt den Fit-Toleranzbereichen entnommen.

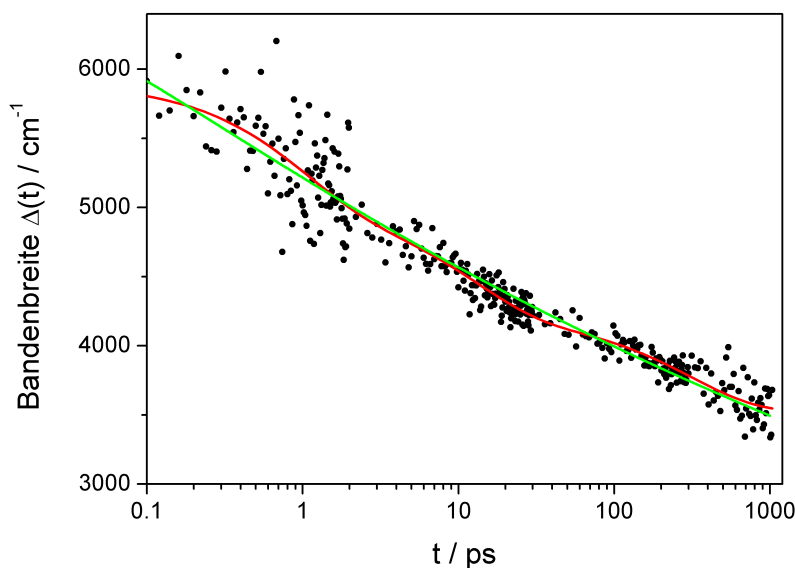
	$A_1/\text{cm}^{-1}$	$t_1/\text{ps}$	$A_2/\text{cm}^{-1}$	$t_2/\text{ps}$	$A_3/\text{cm}^{-1}$	$t_3/\text{ps}$	$A_0/\text{cm}^{-1}$
$\tilde{\nu}(t)$	$650 \pm 60$	$0.32 \pm 0.05$	$630 \pm 50$	$2.3 \pm 0.4$	$110 \pm 30$	$21 \pm 8$	$16805 \pm 4$
$\Delta(t)$	$890 \pm 80$	$1.0 \pm 0.2$	$800 \pm 80$	$12 \pm 3$	$690 \pm 50$	$310 \pm 80$	$3520 \pm 50$

$\Delta$  zu kleinen Verzögerungszeiten sehr hoch ist, könnte eine schnellere Dynamik der Umgebungsrelaxation verdeckt werden. Der Abfall der Bandbreite wird am besten durch ein Exponentengesetz beschrieben (Gleichung 3.3).

$$\Delta(t) = \Delta_{\infty}(1 + t/t_0)^{-n} \quad (3.3)$$

Der Vorfaktor  $B_{\infty} = 6600 \pm 700 \text{ cm}^{-1}$  ist dabei notwendig, da  $\Delta(t)$  nicht normiert wurde. Der Exponent ist mit  $n = 0.0581 \pm 0.001$  deutlich kleiner als jene Exponenten ( $n \sim 0.15$ ), welche zur Beschreibung der Umgebungsdynamik von DNA mit Cumarin 102<sup>[85,86]</sup> als Basenanalogen oder DAPI als Interkalationsfarbstoff<sup>[81]</sup> verwendet wurden. Die Dynamik der Halbwertsbreite ist also noch einmal langsamer als die Relaxation der Gegenionen und der Wassermoleküle in den Furchen. Dieser Abfall von  $\Delta$  kann auch nicht allein durch das Verschieben der Z-Bande, weg von der überlappenden C-Bande und dem aufkonvertierten Pumplicht mit der Zeit erklärt werden. Dies ist allerdings die Ursache für die starke Streuung der Bandbreite bei kleineren Verzögerungszeiten. Insgesamt streuen die Werte für die Bandenbreite stärker als die der Peakpositionen, das *RMSD* zum Exponentengesetz-Fit beträgt  $RMSD = 161 \text{ cm}^{-1}$ .

Zum Vergleich ist in Abbildung 3.10 ebenfalls ein triexponentieller Fit gezeigt, dessen Struktur jedoch in den Datenpunkten nicht beobachtet, beziehungsweise aufgelöst werden konnte. Die Parameter dazu befinden sich in Tabelle 3.1. Das *RMSD* ist mit  $157 \text{ cm}^{-1}$  leicht besser als für das Exponentengesetz, da aber deutlich mehr Parameter in den Exponentialfit eingehen ist dieser Vorteil vernachlässigbar.



**Abbildung 3.10:** Zeitlicher Verlauf der Halbwertsbreite  $\Delta(t)$  der Z-Bande von 13mer6HQ (Punkte). Er wird am besten beschrieben durch ein Exponentengesetz (grün). Zum Vergleich ist ein triexponentieller Fit (rot) abgebildet.

### 3.1.3 Diskussion und Zusammenfassung

Wie bereits erwähnt, existieren auf dem Gebiet der Solvatationsdynamik mittels fs-Spektroskopie von DNA zahlreiche Publikationen mit diversen DNA-Farbstoffsystemen. Das hier verwendete System 13mer6HQ und die Ergebnisse der FLUPS-Messungen sollen daher mit diesen verglichen werden. Der Chromphor 6-Oxychinoliniumbetain Q zeichnet sich gegenüber anderen verwendeten Chromophoren durch seine geringe Größe, die relativ hohe Lebensdauer des angeregten Zustands, sowie den großen gesamten Stokes-Shift aus. Als DNA-Basenanalogen wurde im Intervall von 0.1-1000 ps allerdings nur eine Verschiebung von  $\Delta\tilde{\nu} = 1200 \text{ cm}^{-1}$  beobachtet, was vergleichbar ist mit dem Interkalationsfarbstoff H33258. Die DNA-Struktur von 13mer6HQ ist bekannt und weicht nur leicht von der natürlichen B-DNA-Struktur ab, störende Konformere treten nicht auf.<sup>[99]</sup>

Ungünstig sind die niedrige Oszillatorenstärke von Q, sowie die Wasserstoffbrücke, welche die künstliche Base zu seiner Gegenbase Cytosin ausbildet. Der Farbstoff lag dadurch nur zu einem geringen Anteil deprotoniert vor, um als Polaritätssonde zu dienen, wird allerdings die deprotonierte Form 6-Oxychinoliniumbetain benötigt. Die protonierte Form

stört durch ihre C-Bande die Auswertung. Um eine Messung zu ermöglichen, mussten Konzentration und Pumpleistung erhöht werden, was gestreutes Pumplicht als zusätzliche Störung hervorruft. Außerdem musste ein dickerer Kristall verwendet werden, was die mögliche Zeitauflösung von 100 fs auf  $\sim 200$  fs verschlechterte.

Insgesamt besitzt das System 13mer6HQ also keine der Nachteile, welche für frühere Studien zur Untersuchung der Umgebungsdynamik von Nukleinsäuren auftraten, es weist jedoch einen bedeutenden neuen Nachteil auf.

Die aus dem exponentiellen Fit von  $\tilde{\nu}(t)$  erhaltenen Zeitkonstanten stimmen gut mit dem Gesamtbild der Literatur überein. Für eine genaue Zuordnung der Zeitkonstanten zu molekularer Relaxation von Wasser, DNA oder Gegenionen müsste exakt dieses System simuliert werden. Überträgt man aber die Zuordnung, welche durch MD-Simulationen an einem DNA-12mer Doppelstrang getroffen wurden<sup>[94]</sup> auf dieses System, so ergibt sich, dass die umgebende Wassermoleküle auf Zeitskalen von  $0.32 \pm 0.05$  ps bzw.  $2.3 \pm 0.4$  ps relaxieren, während die längere Zeitkonstante von  $21 \pm 8$  ps DNA-Relaxierung zuzuschreiben ist. Dynamik auf einer deutlich größeren Zeitskala wurde nicht beobachtet, kann aufgrund des starken Streulichts beziehungsweise niedrigen Signalstärke bei längeren Verzögerungszeiten aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da die Streuung der Peakpositionen  $200 \text{ cm}^{-1}$  nicht übersteigt, kann die Amplitude einer solchen längere Zeitkonstante jedoch nicht groß sein. Die Umgebungsdynamik von 13mer6HQ ist insgesamt im Vergleich zu anderen Systemen etwas schneller, was durch Bestimmung von mittleren Solvatationszeiten für alle relevanten Systeme gezeigt wurde. Der zeitliche Verlauf der Bandenbreite stellt Fragen auf, welche zum Beispiel durch Simulationen weiter untersucht werden sollten.

Die künstliche Base 6HQ, verknüpft über einen Glycerinlinker, kann auch in weitere Nukleinsäuren eingebaut werden, um Umgebungsdynamik beispielsweise in natürlicher DNA, RNA oder Quadruplex-DNA zu bestimmen. FLUPS-Messungen des verbesserten 13-mers, welches das künstliche Basenpaar 4AP-DAP enthält, sind jedoch das nächste Ziel auf diesem Gebiet.

## 3.2 Phospholipide

### 3.2.1 Literaturüberblick

Phospholipide bilden in Wasser aufgrund ihres rechteckigen Van-der-Waals-Umriss' vesikuläre Doppelschichtstrukturen (Liposomen) und stellen die Hauptkomponente von Biomembranen dar.<sup>[4,101]</sup> Die Dynamik von Wassermolekülen an der Grenzfläche, also nahe der polaren Kopfgruppen wurde zum Beispiel mittels Kern-Overhauser-Effekt-NMR-Spektroskopie<sup>[102]</sup> und kohärenter Anti-Stokes Raman-Mikroskopie<sup>[103]</sup> untersucht. Es wurde eine eingeschränkte Beweglichkeit der Wassermoleküle und langlebige Lipid-Wasser-Assoziate ( $\sim 100$  ps) postuliert. Diese Ergebnisse wurden durch MD-Simulationen Studien bestätigt.<sup>[104]</sup>

Interessanterweise wurden keine fs-Fluoreszenzmessungen vorgenommen, um die Solvationsdynamik um Phospholipid-Vesikel, Modelle von Zellen, zu untersuchen. Die erwähnten langlebigen Assoziate ermöglichen allerdings Fluoreszenzmessungen auf der ps-Zeitskala mittels TCSPC auf einzelnen Wellenlängen mit anschließender spektraler Rekonstruktion. Es wurden die Farbstoffe DCM<sup>[105,106]</sup> und Cumarin 480<sup>[107]</sup> in einer Lösung gemessen, welche auch Phospholipidvesikel enthielt. Es konnten allerdings nur Vermutungen angestellt werden, wo genau sich die Farbstoffe befanden. Die gemessene Dynamik ist also nicht direkt einer bestimmten Umgebung, wie der Kopfgruppenregion, zuordenbar. Anhand der in diesen Publikationen angegeben Zeitkonstanten und Amplituden des normierten zeitabhängigen Stokes-Shifts  $S(t)$  wurden mittlere Solvationszeiten  $\tau_{solv}$  von 1.1, 4.4, beziehungsweise 6.8 ns erhalten.

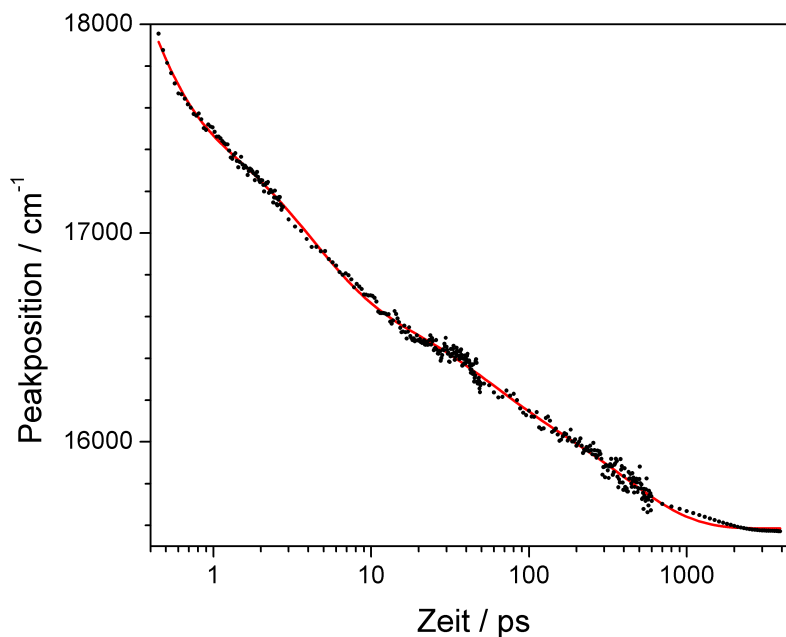
Das Problem der genauen Positionierung des Farbstoff kann für Phospholipidvesikel gelöst werden, indem polare Farbstoffe mit langen Alkylketten verwendet werden, da diese in die Membran eingelagert werden. Am häufigsten wurde dabei der Farbstoff Laurdan verwendet,<sup>[108–110]</sup> dessen Chromophor sich etwa auf der Höhe der polaren Kopfgruppen befindet.<sup>[109]</sup> Die berechneten Solvationszeiten für Laurdan in Vesikel sind mit 1.7 ns

(monoexponentieller Abfall) beziehungsweise 1.4 ns (83 % 0.7 ns, 17 % 3.36 ns) in guter Übereinstimmung. Es wurde ebenfalls der Fluoreszenzanisotropieabfall gemessen, und es ergab sich eine Übereinstimmung zur Umgebungsdynamik.<sup>[110]</sup>

Zu diesem System wurden MD-Simulationen und TDDFT-Rechnungen durchgeführt,<sup>[111]</sup> die nahelegen, dass der zeitabhängige Stokes-Shift insgesamt auf vier Zeitskalen abfallen sollte. Die zwei schnelleren Dynamiken wurden dabei der Relaxation von Wassermolekülen zugeordnet, die beiden langsameren der Relaxation der ebenfalls polaren Kopfgruppen. Ebenfalls wurde vorhergesagt, dass der Chromophor nach Anregung in Richtung der polaren Kopfgruppen diffundiert.

Bedingt vergleichbar sind Ergebnisse von 3-Puls-Photonenecho-Spektroskopie aus dem Labor von Prof. Vöhringer.<sup>[112,113]</sup> Die verwendete Sonde, der Cyaninfarbstoff 1,1'-Di-octadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbon-chlorid, weist zwei lange Alkylketten auf. Es umschließt bei der Einlagerung in die Membran allerdings ein Lipidmolekül, sodass sich der Chromophor weit oberhalb der Kopfgruppenregion befindet. Aus dem Abfall des Signals in Abhängigkeit der beiden Wartezeiten zwischen den drei Pulsen kann ebenfalls die Relaxation  $S(t)$  berechnet werden. In zwei aufeinanderfolgenden Arbeiten wurden Daten veröffentlicht, die Solvatationszeiten von 570 fs<sup>[112]</sup> beziehungsweise 137 ps<sup>[113]</sup> ergeben würden. Beide Datensätze sind anzuzweifeln, da im ersten Fall das beobachtete Fenster nur 50 ps betrug und im zweiten Fall eine ähnlich langsame Dynamik für Bulkwasser gefunden wurde. Dies ist wahrscheinlich auf intramolekulare Relaxation der Sonde zurückzuführen.

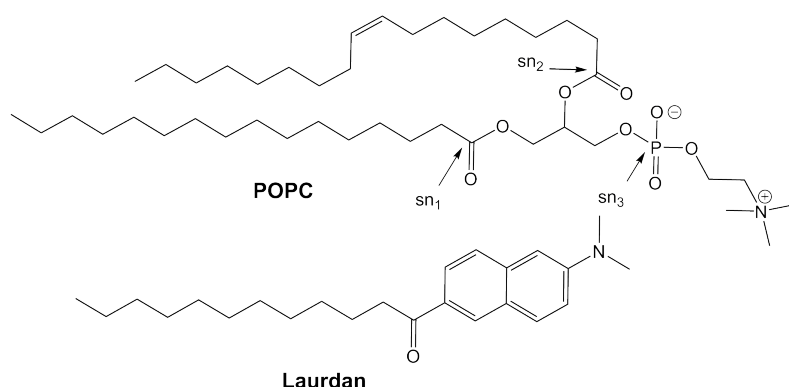
Die einzige Publikation, bei der Fluoreszenz mit einer sub-ps Auflösung in diesem Feld gemessen wurde, präsentiert Typ-1 Aufkonversionsdaten von Tryptophan in Mischungen von 60 % 2-Oleoylglycerol (bildet kubische Lipidphasen) und 40% Wasser mit einer Zeitauflösung von 400 fs.<sup>[114]</sup> Da keine Lipiddoppelschichten gebildet werden, das zeitlich beobachtbare Fenster begrenzt ist und weiterhin keine Aussagen über die Positionierung des Tryptophans (welches wie in Abschnitt 3.1 beschrieben einen sehr kleinen Stokes-Shift aufweist) getroffen werden können, ist die berechnete Solvatationszeit von 37 ps kaum ver-



**Abbildung 3.11:** Zeitlicher Verlauf von  $\tilde{\nu}(t)$  für C18Q in POPC-Doppelschichten (Punkte) und quadexponentieller Fit (rote Linie).<sup>[58]</sup>

gleichbar.

In der Diplomarbeit des Autors wurden drei verschiedene Membranfarbstoffe in 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin (POPC)-Vesikel eingebaut und mit FLUPS gemessen.<sup>[58]</sup> Die neu vorgestellten Polaritätssonden 6-Oxy-1-stearylchinolinium Betain C18Q und 7-Stearyl-amino-4-trifluoromethylcumarin zeigten sich als relativ ungeeignet zur Messung der Umgebungsdynamik. In beiden Fällen waren Chromophorkonzentrationen von 10 mM benötigt, um genügend Signal detektieren zu können. Da aufgrund von starker Streuung allerdings auch niedrige Lipidkonzentrationen vorliegen müssen, betrug das Verhältnis von Lipid- zu Sondenmolekülen nur 4:1. Für C18Q wurden zusätzlich TCSPC-Spuren für vier Wellenlängen gemessen und der TDSS konnte erweitert werden mithilfe von spektraler Rekonstruktion, kalibriert an einem späten Spektrum aus der FLUPS-Messung (siehe Abschnitt 3.2.2). Der zeitliche Verlauf der Peakposition  $\tilde{\nu}(t)$  ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Ein Fit mit vier Exponentialfunktionen ergab Zeitkonstanten von  $0.23 \pm 0.03$ ,



**Abbildung 3.12:** Strukturen des Lipids POPC und des Membranfarbstoffs Laurdan.

$3.7 \pm 0.2$ ,  $43 \pm 4$  und  $408 \pm 18$  ps, allerdings sind keine vier exponierten Relaxationsintervalle zu erkennen. Der Abfall des TDSS entspricht einer Solvatationszeit von 64 ps. Aufgrund der starken Streuung sind die Spektren zu frühen Zeiten von Phospholipidlösungen stark überlagert von Ramansignalen nahe der Anregung. Hier ist der Vorteil dieses Chromophors ersichtlich. Durch den großen Stokes-Shift werden Spektren ab etwa 450 fs nach Anregung auswertbar. Die Zeitauflösung betrug in diesen Messungen etwa 400 fs und die Fluoreszenzbanden waren teilweise stark durch Gate-Harmonische überlagert.

In der beschriebenen Diplomarbeit wurde auch der Farbstoff Laurdan in POPC-Liposomen mit FLUPS gemessen. Aufgrund der höheren Oszillatorenstärke des Chromophors konnte bei gleicher Lipidkonzentration der Anteil der Polaritätssonden in den Membranen auf 1% verringert werden. Allerdings ist die Stokes-Verschiebung für diesen Chromophor relativ klein, sodass frühe Spektren aufgrund der Ramansignale nicht detektierbar waren.

In dieser Arbeit soll das System Laurdan in POPC-Vesikeln (Strukturen in Abbildung 3.12) weiter untersucht werden.

### 3.2.2 Laurdan in POPC-Liposomen

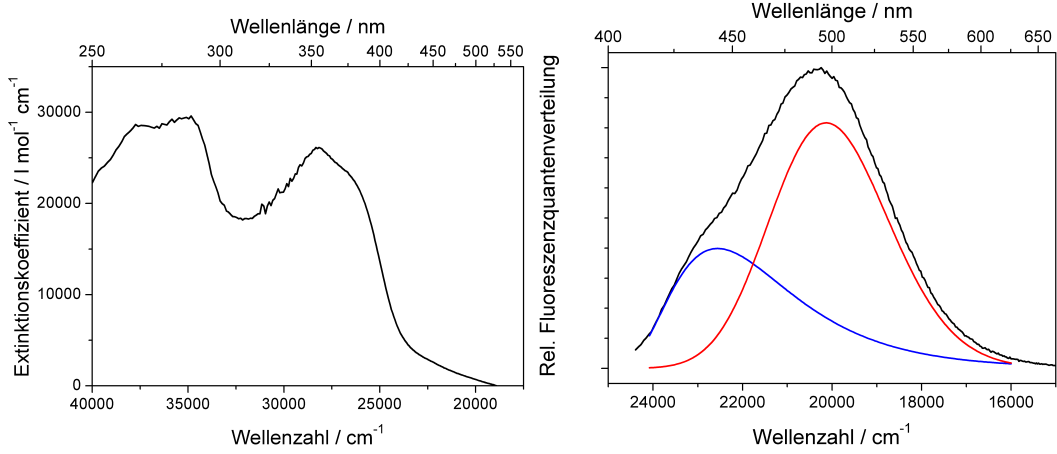
#### Probenvorbereitung und stationäre Spektren

Lösungen, beziehungsweise Suspensionen von multilamellaren großen Vesikeln wurden über die Lipidfilmmethode erhalten (für Details siehe Experimententeil). Diese Suspension wurde durch eine Membran mit 100 nm Porengröße extrudiert, sodass unilamellare Vesikel von 70-80 nm erhalten wurden.<sup>[115]</sup> Das Verfahren wurde wiederholt zur Darstellung von Suspensionen, welche reine POPC-Liposomen gleicher Konzentration und Größe zu erhalten. Eine Absorptionsmessung dieser Suspension ergibt eine wellenlängenabhängige Streukurve, welche als Referenz für die Absorptionsmessung der markierten Vesikelsuspension diente. Das Resultat ist in Abbildung 3.13 links gezeigt. Die Struktur auf der  $S_1 \leftarrow S_0$ -Bande ist in Spektren reinen Laurdans in Methanol nicht vorhanden. Da Laurdan in Wasser nicht löslich ist, könnte dies ein Hinweis auf eine bimodale Verteilung von Laurdanmolekülen in den Membranen sein, welche bereits vorher beobachtet wurde.<sup>[116]</sup> Dabei wurde suggeriert, dass der Hauptteil der Chromophore sich in der polaren Kopfgruppenregion befindet, während ein geringer Teil im unpolaren Kettenreich lokalisiert ist. Im Fluoreszenzspektrum, angeregt bei 400 nm, ist ebenfalls eine Schulter zu erkennen, sodass es mit zwei Lognormalfunktionen gefittet wurde (Abbildung 3.13, rechts). Die Hauptkomponente weist dabei ein Maximum bei  $20132\text{ cm}^{-1}$  auf, bei einer Breite von  $\Delta = 3114\text{ cm}^{-1}$ . Die kleinere Komponente (blau) hat weniger den Charakter einer einzelnen Bande, sondern stellt eher selbst eine Verteilung dar. Dieses Verhalten wird anhand von transienten Spektren und anregungswellenlängenabhängigen Fluoreszenzspektren weiter untersucht werden.

#### Zeitaufgelöste Fluoreszenz

Auch dieses System (Laurdan in POPC-Liposomen) stellt eine gewisse Herausforderung an die zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie dar. In Abbildung 3.14 ist das aufkonvertierte Fluoreszenzspektrum 2 ps nach Anregung dargestellt, es wurde bereits gemittelt, aber noch nicht photometrisch korrigiert. Deutlich zu sehen sind hier das gestreute, nichtauf-



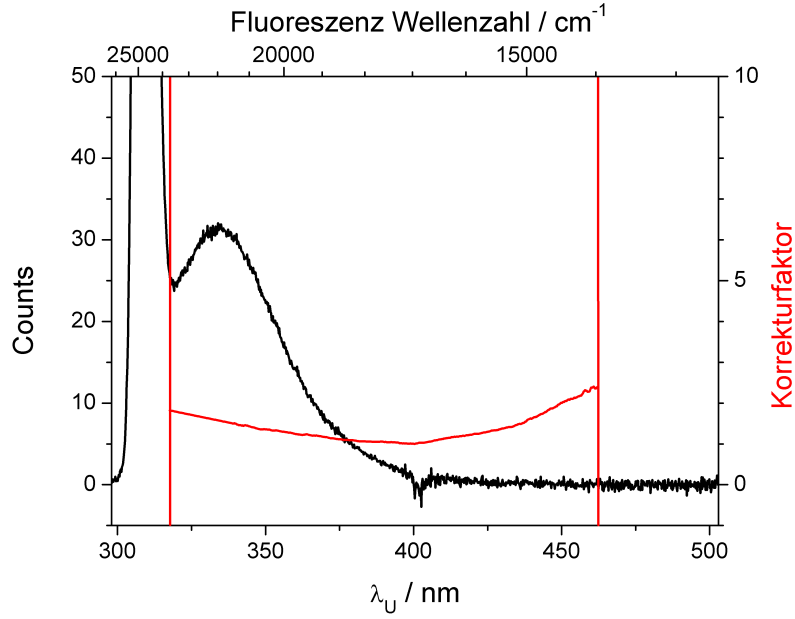


**Abbildung 3.13:** Extinktions- (links) und Fluoreszenzspektrum (rechts) von Laurdan in POPC-Liposomen. In blau und rot sind Komponenten eines Fits mit zwei Lognormalfunktionen gezeigt.

konvertierte Pumplicht bei  $\lambda_{Up} = 400$  nm als negativer Anteil (durch längere Mittelung des Hintergrunds) und das sehr starke aufkonvertierte Ramansignal bei  $\lambda_{Up} = 310$  nm bzw.  $\tilde{\nu}_F = 25000$  cm<sup>-1</sup>. Dadurch dass die Fluoreszenzbande von Laurdan deutlich im Bereich hoher Wellenzahlen liegt, wird das Signal nur vom aufkonvertierten Streulicht überlagert. Die Harmonische des Gate und das nichtaufkonvertierte Pumplicht stören nicht. Die Bestimmung des Peakmaximums bei langen Verzögerungszeiten nach Anregung ist deshalb sehr präzise, zu frühen Zeiten allerdings unmöglich. Selbst 2 ps nach Anregung beträgt die Amplitude des Streulichts noch mehr als das zehnfache des aufkonvertierten Fluoreszenzsignals.

Da die Umgebungsdynamik dieses Systems relativ langsam ist wurden zusätzlich TCSPC-Messungen durchgeführt. 5 der 18 gemessenen Zeitspuren sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Sie wurden mithilfe der Gerätefunktion (*instrumental response function, IRF*) mit biexponentiellen Rekonvolutionsfits  $D_\lambda(t)$  beschrieben.

Die spektrale Konstruktion wurde in der Literatur mithilfe des stationären Spektrums durchgeführt.<sup>[109,110]</sup> Das setzt allerdings voraus, dass das stationäre Spektrum komplett durch den beobachteten Abfall beschrieben wird. Mithilfe der photometrisch korrigierten,

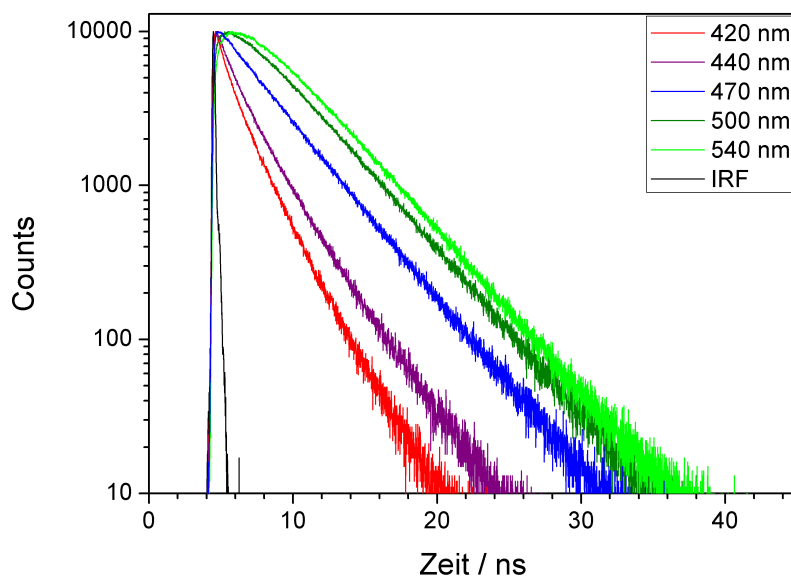


**Abbildung 3.14:** Gemittelt, technisches Fluoreszenzspektrum von Laurdan in POPC-Vesikeln 2 ps nach Anregung aus der 200 fs-Messreihe. Die obere Skala zeigt die entsprechende Fluoreszenz Wellenzahl  $\tilde{\nu}$ . Die Amplitude des gestreuten, aufkonvertierten Ramanlichts bei  $\lambda_{Up} = 310$  nm beträgt 370 Counts (linke Skala). Zusätzlich ist in rot die photometrische Korrekturfunktion (rechte Skala) sowie das Fenster, in welchem diese aufgenommen wurde dargestellt.

zeitaufgelösten Spektren aus FLUPS-Messungen ist es möglich die relativen Amplituden der einzelnen Wellenlängen ohne diese Annahme zu bestimmen.<sup>[58]</sup>

Die Fits  $D_\lambda(t)$  für die TCSPC-Spuren wurden zunächst durch den Abfall des Peakmaximums  $D_{490}(t)$  geteilt, um die Amplitude der zu erstellenden Spektren zu normieren. Weiterhin wurden alle Zeitspuren bei 400 ps auf den Lognormalfit  $T_{FLUPS}(\lambda_F, 400 \text{ ps})$  des entsprechenden Spektrums aus den Aufkonversionsmessungen normiert. Zusammen ergeben diese Zeitspuren damit die zeitaufgelösten, rekonstruierten Spektren  $T_{TCSPC}(\lambda_F, t)$ .

$$T_{TCSPC}(\lambda_F = i, t) = \frac{D_i(t) T_{FLUPS}(i, 400 \text{ ps})}{D_{490}(t) D_i(400 \text{ ps})} \quad (3.4)$$



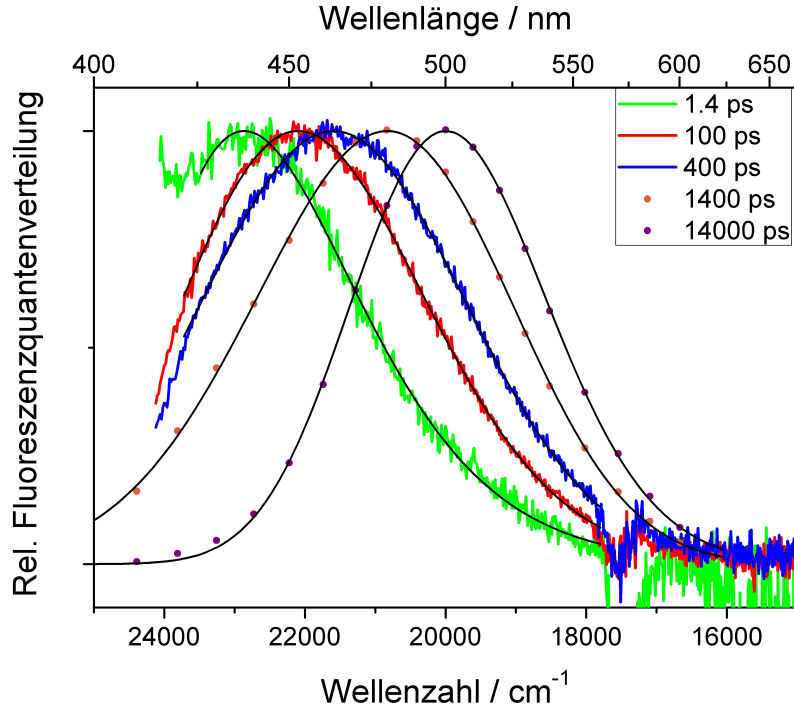
**Abbildung 3.15:** TCSPC-Spuren für ausgewählte Wellenlängen (bunte Linien) und die Gerätefunktion (IRF, schwarz).

Die erhaltenen Spektren und Lognormalfits sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Sie wurden bis 15 ns erstellt, da ab dieser Zeit die Intensität auf jeder Zeitspur unter 1 % des Maximums gefallen ist.

Für den direkten Vergleich mit Literaturwerten wurde der zeitliche Verlauf der Peakposition vorerst nur aus den rekonstruierten Spektren ermittelt und mit exponentiellen Funktionen gefittet (nicht gezeigt). Es ergibt sich für einen monoexponentiellen Fit  $\tau_{solv} = 1.73 \pm 0.3$  ns beziehungsweise  $\tau_{solv} = 1.9$  ns für einen biexponentiellen Fit (32 % 4.03 ns, 68 % 0.960 ns), also eine gute Übereinstimmung mit älteren Messungen.<sup>[109,110]</sup>

Werden zusätzlich die Peakpositionen aus den FLUPS-Messungen herangezogen, so ergibt sich die in Abbildung 3.17 dargestellte Verlauf der Solvatationsdynamik. Nach einem schnellen Abfall bis etwa 2 ps wird beinahe ein Plateau erreicht, es folgt verzögert ein sehr langsamer Abfall. Bereits hier lässt sich vermuten, dass erstmals sowohl Wasser- wie auch Lipidkopfgruppendiffusionsdynamik beobachtet werden konnte.

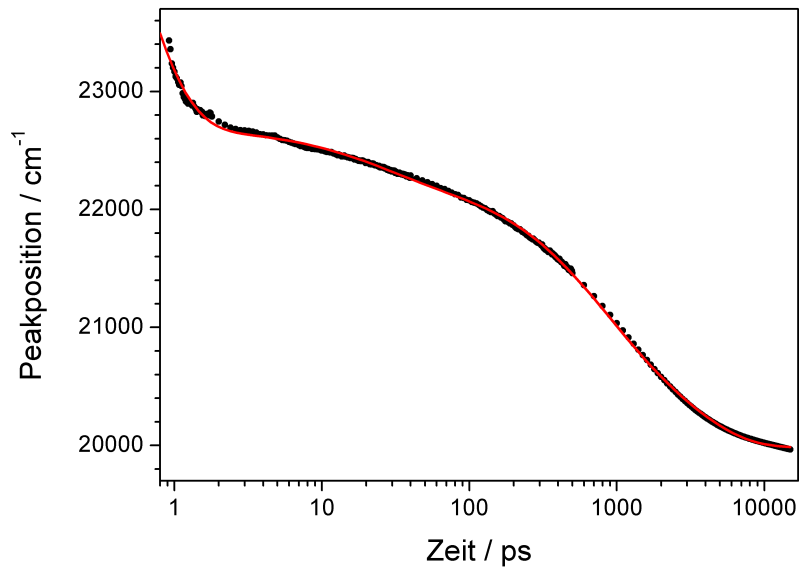
Der zeitabhängige Stokes-Shift wurde mit vier Exponentialfunktionen gefittet, deren Pa-



**Abbildung 3.16:** Zeitabhängige Fluoreszenzspektren von Laurdan in POPC-Vesikeln aus FLUPS-Messungen (bunte Linien) und nach spektraler Rekonstruktion aus TCSPC-Spuren (Punkte). In schwarz sind Lognormal-Fits dargestellt.

parameter in Tabelle 3.2 zusammengefasst sind. Aufgrund fehlender Datenpunkte vor 0.9 ps wird die ultraschnelle Dynamik leider schlecht erfasst. Ebenso ist eine Abweichung beim Übergang von der schnellen zur langsamen Dynamik bei 2 ps zu sehen. Es ergibt sich eine mittlere Solvatationszeit von  $\tau_{solv} = 480 \pm 30$  ps. Die Standardabweichung zu diesem Fit ist mit  $RMSD = 19 \text{ cm}^{-1}$  dennoch sehr gering. Um zu zeigen, dass diese Qualität nicht durch die Rekonstruktion künstlich verbessert wird, werden nur die Datenpunkte aus den FLUPS-Messungen mit einer triexponentiellen Funktion gefittet (nicht gezeigt, Parameter in Tabelle 3.2). Es wird ein  $RMSD$  von  $16 \text{ cm}^{-1}$  erhalten.

In Abbildung 3.16 ist bereits erkennbar, dass die Breite der Fluoreszenzbanden mit der Zeit zunächst zu und später wieder abnimmt. Dies wird in Abbildung 3.18 verdeutlicht, in welcher der Parameter  $\Delta$  aus den Lognormalfits gegen die Zeit aufgetragen ist. Das

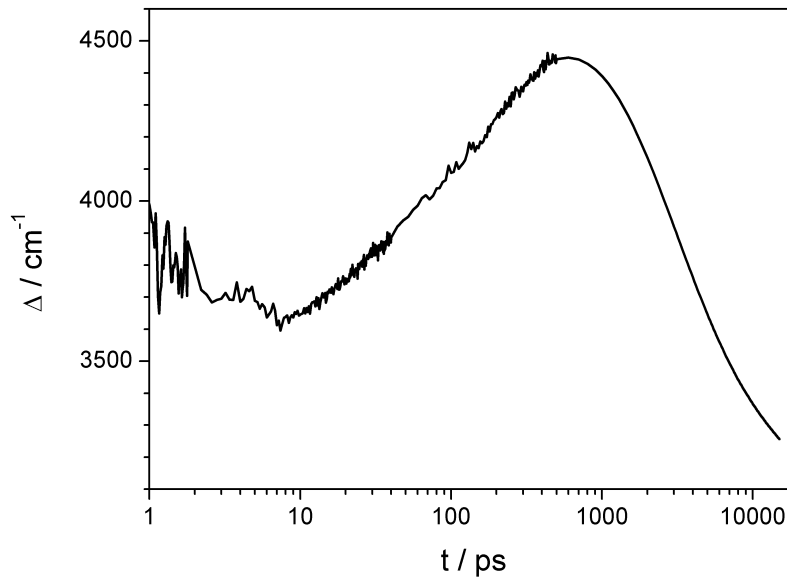


**Abbildung 3.17:** Zeitabhängiger Stokes-Shift für Laurdan in POPC-Vesikeln, zusammengesetzt aus FLUPS und TCSPC-Daten als schwarze Punkte. In rot gezeigt ist ein quadexponentieller Fit.

Maximum wird bei etwa 600 ps erreicht. Dieses Verhalten wurde bereits vorher für diverse Membranfarbstoffe beobachtet, wobei das Maximum für Laurdan/POPC allerdings erst nach 1.5 ns erreicht wurde.<sup>[109]</sup> Für frühe Zeiten streuen die Werte für  $\Delta$  stark, da große Teile der Fluoreszenzbanden von Ramanlicht überlagert sind. Es ist jedoch ein gewisser Trend zu sehen, die Bandenbreite nimmt zuerst ab, bevor sie ab etwa 7 ps nach Anregung ansteigt.

### 3.2.3 Diskussion

Das System Laurdan in POPC-Vesikeln wurde bereits von Sykora *et al.* mittels TCSPC untersucht. Während die gleiche Dynamik des Stokes-Shifts beobachtet wurde ( $\tau_{solv} \sim 1.7$  ns für die Langzeitmessungen) weicht das zeitliche Verhalten der Bandenbreite ab – das Maximum wurde deutlich später erreicht.<sup>[109]</sup> Dies könnte mit der unterschiedlichen Anregungswellenlänge (370 nm) und der bereits erwähnten Struktur des stationären Fluoreszenzspektrums zusammenhängen.



**Abbildung 3.18:** Halbwertsbreiten  $\Delta$  der zeitabhängigen Fluoreszenzspektren gegen die Verzögerungszeit. Sie wurden aus Lognormalfits der Spektren aus den FLUPS- und TCSPC-Messungen erhalten.

Da Laurdan eine positive Solvatochromie aufweist, ist davon auszugehen, dass die Anregung auf der blauen Seite der Absorptionsbande eher Spezies betrifft, die sich in unpolarer Umgebung, also nahe der Lipidschwanzgruppen befinden. Wird die bereits vorhergesagte Diffusion des Chromophors nach Anregung zu den polaren Kopfgruppen<sup>[111]</sup> dem zeitlichen Verlauf von  $\Delta$  zugeordnet, so ergibt sich die Erklärung für das spätere Erreichen des Breitenmaximums, da ein längerer Weg zurückgelegt werden muss.

In Abbildung 3.19 sind Fluoreszenzspektren für unterschiedliche Anregungswellenlängen dargestellt. Es ist gut erkennbar, dass mit steigender Anregungswellenzahl die zweite Bande bei  $\sim 23000 \text{ cm}^{-1}$  ansteigt. Wird der Chromophor an der roten Flanke des Absorptionsspektrums (420 nm) angeregt, so ist diese Komponente fast vollständig verschwunden. Zum Vergleich ist in Abbildung 3.19 ebenfalls das Spektrum bei 3 ps dargestellt, also während des beschriebenen Plateaus von  $\tilde{\nu}(t)$ . Da eine gewisse Übereinstimmung besteht, wird vermutet, dass frühe Spektren zu dieser Schulter beitragen.

**Tabelle 3.2:** Fitparameter für exponentielle Fits von  $\tilde{\nu}(t)$  für Laurdan in POP-Vesikeln. Die Fehlerbereiche wurden direkt den Fits entnommen. Die Zeitauflösung betrug etwa 100 fs.

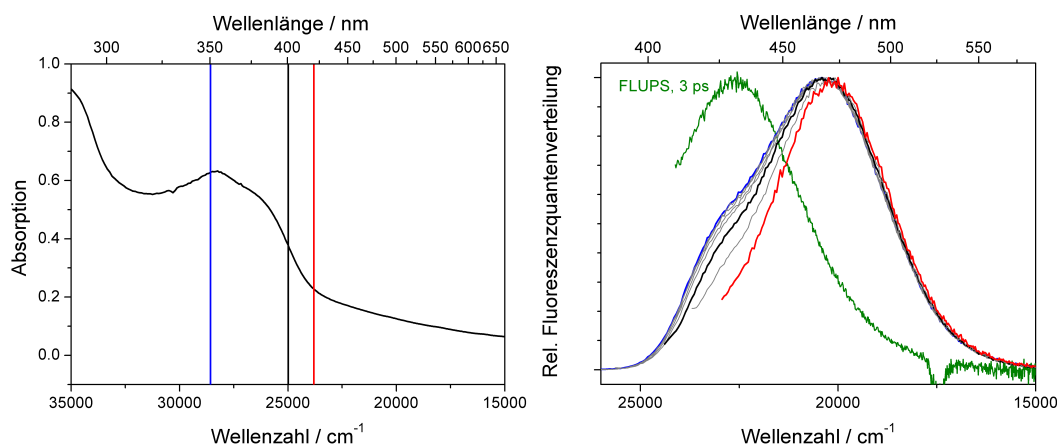
	$A_1$ /cm <sup>-1</sup>	$t_1$ /ps	$A_2$ /cm <sup>-1</sup>	$t_2$ /ps	$A_3$ /cm <sup>-1</sup>	$t_3$ /ps	$A_4$ /cm <sup>-1</sup>	$t_4$ /ps	$A_0$ /cm <sup>-1</sup>
FLUPS &TCSPC	5400 ±400	0.42 ±0.01	420 ±7	22.8 ±0.8	1140 ±40	630 ±20	1150 ±40	2740 ±90	19982 ±4
Simula- tion <sup>[111]</sup>	-	10-50	-	100- 500	-	750- 1.6	-	>2500	
FLUPS	22000 ±3000	0.252 ±0.009	399 ±7	8.0 ±0.3	1130 ±10	285 ±7	-	-	21300 ±13

In den transienten Fluoreszenzspektren ist keine Struktur zu erkennen, jedoch ist die blaue Flanke aufgrund des Streulichts nicht vollständig zu sehen. Wie bereits erwähnt variiert aber die Bandenbreite mit der Zeit. Diese Variation findet vor allem auf der blauen Seite der Bande statt.

Seidel *et al.* merkten an, dass der zeitliche Verlauf der Peakposition im Fall von Laurdan in Membranen ungeeignet ist zur Erfassung der Umgebungsdynamik, aufgrund der zeitlichen Variation der Bandenform.<sup>[110]</sup>

Auffällig ist, dass im Zeitfenster von etwa 3 bis 300 ps die Peakwellenzahl weniger abnimmt, als im Bereich von 300 bis 3000 ps. Da diese Bereiche mit dem Steigen und Fallen der Bandbreite korrespondieren, wird untersucht, ob der zeitabhängige Stokes-Shift durch die Bandenbreite beeinflusst wird. Der Schwerpunkt C der Fluoreszenzbande vereint alle Lognormalparameter für ein Spektrum, auch die Bandenbreite.

$$C(t) = \frac{\int T(\tilde{\nu}, t) \tilde{\nu} d\tilde{\nu}}{\int T(\tilde{\nu}, t) d\tilde{\nu}} \quad (3.5)$$

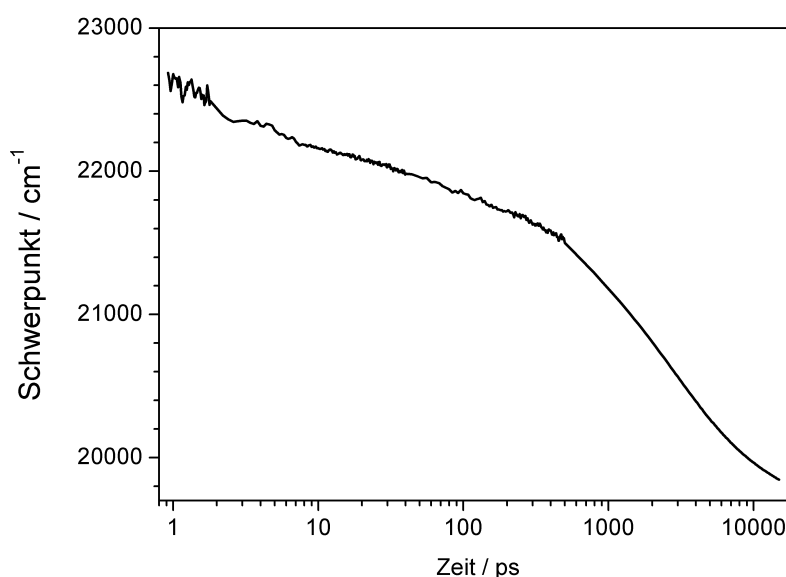


**Abbildung 3.19:** Absorptionsspektrum von Laurdan in POPC-Liposomen (links) und anregungswellenlängenabhängige Fluoreszenzspektren (rechts). Eingezeichnet sind Fluoreszenzspektren nach Anregung bei 350 nm (blau) bis 420 nm (rot) in 10 nm Schritten. Das Spektrum nach Anregung bei 400 nm ist in schwarz hervorgehoben. Zusätzlich wurde das Spektrum bei 3 ps nach Anregung aus den Aufkonversionsmessungen zum Vergleich in grün dargestellt.

Sein zeitlicher Verlauf für dieses System ist in Abbildung 3.20 dargestellt und zeigt qualitativ den gleichen Verlauf, wie  $\tilde{\nu}(t)$ . Ein Unterschied zu sehr frühen Zeiten ist zu vernachlässigen, da durch die Überlagerung des Ramanlichts die Bestimmung des Peakmaximums deutlich genauer ist als die Bestimmung der Bandenform.

In einer kombinierten Quantenmechanik- und MD-Simulationsstudie wurde Laurdan, eingebettet in Dioleoylphosphatidylcholin-Membranen untersucht.<sup>[111]</sup> Es wurde gezeigt, dass der Chromophor aufgrund der Dipolmomenterhöhung nach Anregung sich leicht in Richtung der polaren Kopfgruppen bewegt. Für den gesamten zeitabhängigen Stokes-Shift wurden wie bereits erwähnt 4 Zeitkonstanten vorhergesagt: 0.01-0.05 ns, 0.1-0.5 ns, 0.75-1.6 ns und >2.5 ns. Diese Daten wurden zum Vergleich ebenfalls in Tabelle 3.2 eingetragen. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung, wenn man bedenkt, dass sich die Zeitkonstante  $t_3 = 630$  ps aufteilt, wenn mit 5 Exponentialfunktionen gefittet wird (nicht gezeigt). Es lässt sich also eine Zuordnung der beobachteten Dynamik der Fluoreszenzbande nach Anregung zur Molekularität der Umgebungsdynamik herstellen.





**Abbildung 3.20:** Bandenschwerpunkt gegen die Verzögerungszeit aus Lognormalfits der zeitabhängigen Fluoreszenzspektren aus FLUPS und TCSPC-Messungen. Qualitativ zeigt sich der gleiche Verlauf, wie in Abbildung 3.17.

Nach Anregung kann zunächst schnelle Wasserdynamik beobachtet werden. Aufgrund des leicht verdrillten Übergangszustands<sup>[111]</sup> wird diese wahrscheinlich durch intramolekulare Relaxation überlagert. Auf einer Zeitskala von 8-20 ps wird die Reorientierung von gebundenen Wassermolekülen verfolgt. Der Chromophor bewegt sich nach Anregung in Richtung der polaren Kopfgruppen, was zunächst zu einer Verbreiterung, dann zu einer Verschmälerung der Fluoreszenzbande führt. Die Relaxation mit einer Zeitkonstante von 630 ps wird dabei sowohl stark gebundenem Wasser, wie auch Lipid-Kopfgruppendiffusion zugeordnet. Durch die Diffusion des Chromophors reagiert ein Großteil der voluminösen Kopfgruppen etwas verzögert und mit sehr langsamer Dynamik ( $\sim 2.7$  ns).

### Zusammenfassung

Es wurde das bereits bekannte System Laurdan in POPC-Doppelschichten untersucht, wobei dies die erste Arbeit ist, bei der die Umgebungsdynamik von 1 ps bis 15 ns nach

Anregung beobachtet werden konnte. Die Bestimmung des Peakmaximums erfolgte dabei sehr präzise ( $RMSE = 16 \text{ cm}^{-1}$  zum Fit). Durch den Vergleich mit Ergebnissen von Simulationen konnte die Relaxation von stark gebundenen Wassermolekülen isoliert werden.

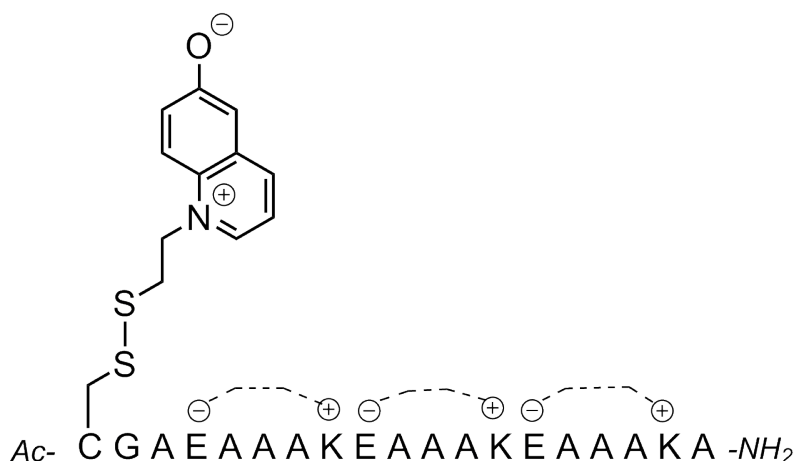
## 3.3 Peptid

### 3.3.1 Literaturüberblick

Die Interaktionen zwischen Proteinen und Wasser sind sehr komplex und stark diskutiert in der Literatur.<sup>[4,5,117–119]</sup> Wassermoleküle in der Nähe von Proteinen wurden mit verschiedensten Techniken untersucht, wie Typ-1 Fluoreszenz-Aufkonversion,<sup>[117,119–122]</sup> NMR-Spektroskopie,<sup>[118,123,124]</sup> THz-Spektroskopie,<sup>[15,125,126]</sup> 2D-IR-Spektroskopie,<sup>[127]</sup> und der Messung des optischen Kerr-Effekts (OKE),<sup>[128]</sup> zusätzlich zu MD-Simulationen.<sup>[129–134]</sup> Allgemein anerkannt ist dabei, dass Proteine die Dynamik von Wassermolekülen verlangsamen. Primärer Gegenstand der Diskussion ist das Ausmaß dieser Verlangsamung.

Aus Ergebnissen von Fluoreszenz-Aufkonversionsexperimenten von Tryptophan (Kommentare zu diesem Chromophor siehe Abschnitt 3.1) an verschiedenen Proteinen wurde ein allgemeines Modell vorgeschlagen: An der Oberfläche von Proteinen tauscht schnelles Bulk-Wasser mit langsamen „biologischen Wasser“ aus.<sup>[117]</sup> Dieses strikt bipolare Modell wurde modifiziert zu einem dynamischeren, bei welchem das um bis zu eine Größenordnung langsamere Wasser „versklavtes Wasser“ genannt wird.<sup>[119]</sup> Dagegen wurde aus NMR-Studien<sup>[124,135]</sup> und MD-Simulationen<sup>[131,133]</sup> eher eine Hinderung der Dynamik um den Faktor 2-3 beobachtet.<sup>[134]</sup>

In mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass das Ausmaß der Verlangsamung des Umgebungswassers abhängig vom genauen Ort auf der Oberfläche des Proteins ist.<sup>[121,127,131]</sup> In 2D-IR-Experimenten wurden Enzyme an bestimmten Stellen mit Ruthenium-Vibrationssonden markiert und eine Abhängigkeit der Solvatationsdynamik von der Sekundärstruktur vorgeschlagen. Es konnte beobachtet werden, dass nahe strukturierter  $\alpha$ -Helices eher gebundenes Wasser vorliegt, wohingegen nahe eines eher unstrukturierten Bereichs des Enzyms bulkähnliches Umgebungswasser gefunden wurde.<sup>[127]</sup> Darüber hinaus wurde in einer theoretischen Arbeit (MD-Simulation) stark verlangsamtes Wasser nur in den Bindungstaschen nahe der aktiven Zentren der Enzyme gefunden.<sup>[131]</sup>



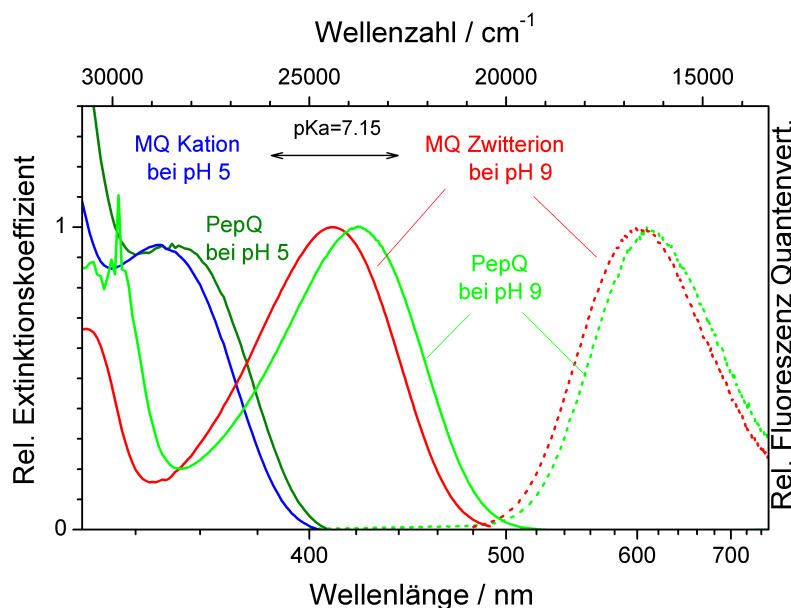
**Abbildung 3.21:** Struktur des Modellpeptids PepQ. Die  $\alpha$ -Helix wird durch 3 Salzbrücken, die jeweils von Lysin zu Glutaminsäure ausgebildet werden, stabilisiert (gestrichelte Linien).

In diesem Abschnitt soll die Solvatationsdynamik eines Modellpolypeptid einer ausgewählten Sekundärstruktur ( $\alpha$ -Helix), markiert mit einer Polaritätssonde in wässriger Lösung untersucht werden.

### 3.3.2 Modellpeptid PepQ

Es wurde ein 17-mer Polypeptid (Ac-AEAAAKEAAAKEAAAKA-NH<sub>2</sub>, Pep) verwendet, für welches eine Helikalität von  $pH = 4 - 11$  in wässrigen Lösungen gegeben ist.<sup>[136]</sup> Es besteht aus einer dreifachen Abfolge von jeweils einer Glutaminsäure, 3 Alanin und einem Lysin. Die Helixbildung der Alanin-Region wird dabei stabilisiert durch (i+4)-Salzbrücken vom Lysin zur Glutaminsäure.<sup>[136,137]</sup> Dieses Peptid wurde von Celin Richter am N-Terminus um einen Glycin-Spacer und ein Cystein erweitert, wodurch sich folgende Primärstruktur ergibt: Ac-CG-AEAAAKEAAAKEAAAKA-NH<sub>2</sub>. An das Cystein wurde per Iod-Acetamidverlinkung die Polaritätssonde Q gekuppelt. Die finale Struktur des erhaltenen, markierten Polypeptids PepQ ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

Die stationären Absorptions- und Fluoreszenzspektren dieses Systems wurden bei  $pH = 5$



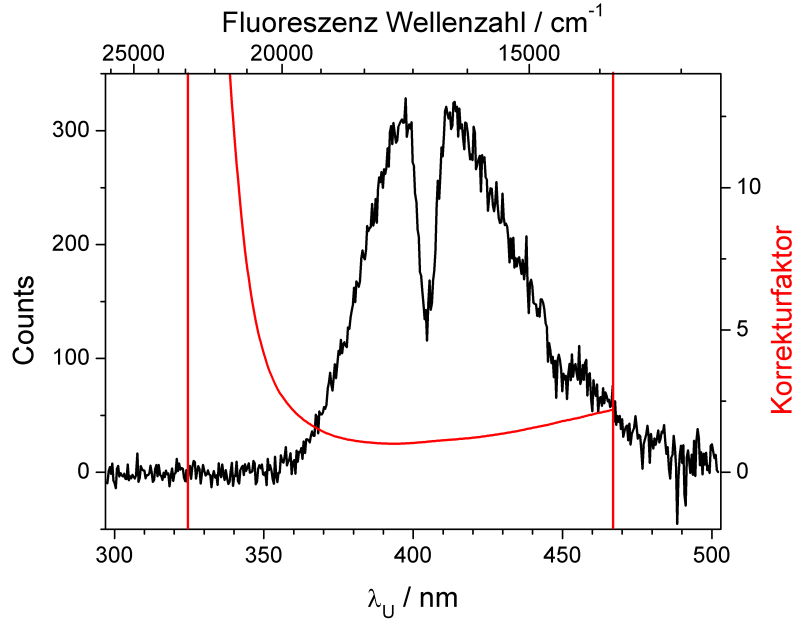
**Abbildung 3.22:** Stationäre Absorptions- (durchgezogene Linien) und Fluoreszenzspektren (gestrichelt) von PepQ. Spektren bei  $pH = 9$  sind in hellgrün dargestellt, bei  $pH = 5$  ergibt sich das gleiche Fluoreszenzspektrum (Anregung bei 353 nm), das Absorptionsspektrum für diesen  $pH$ -Wert ist in dunkelgrün gezeigt. Zum Vergleich sind auch die entsprechenden Spektren von MQ (rot für  $pH = 9$ , blau für  $pH = 5$ ).

und  $pH = 9$  aufgenommen und mit MQ in Wasser bei entsprechendem  $pH$  verglichen, siehe Abbildung 3.22. Es konnte beobachtet werden, dass alle Spektren von PepQ im Vergleich zu MQ zu höheren Wellenzahlen verschoben sind. Bereits lange ist bekannt, dass der Chromophor Q eine starke Photosäure darstellt.<sup>[26,138–141]</sup> Dies spiegelt sich auch hier in den stationären Spektren wider: Sowohl protonierte wie auch deprotonierte Form (bei  $pH = 5$  bzw.  $pH = 9$ ) zeigen das gleiche Fluoreszenzspektrum. Es handelt sich dabei um das Fluoreszenzspektrum der protonierten Form (Z-Bande). Die protonierte Form 6-Hydroxychinolinium wird aufgrund der starken Ladungsverschiebung im angeregten Zustand durch das Solvens deprotoniert, der  $pK_a$  beträgt im angeregten Zustand -4. Es wurde gezeigt, dass dieser Protonentransfer der Solvationsdynamik seiner Umgebung folgt.<sup>[26]</sup>

### 3.3.3 Solvationsdynamik

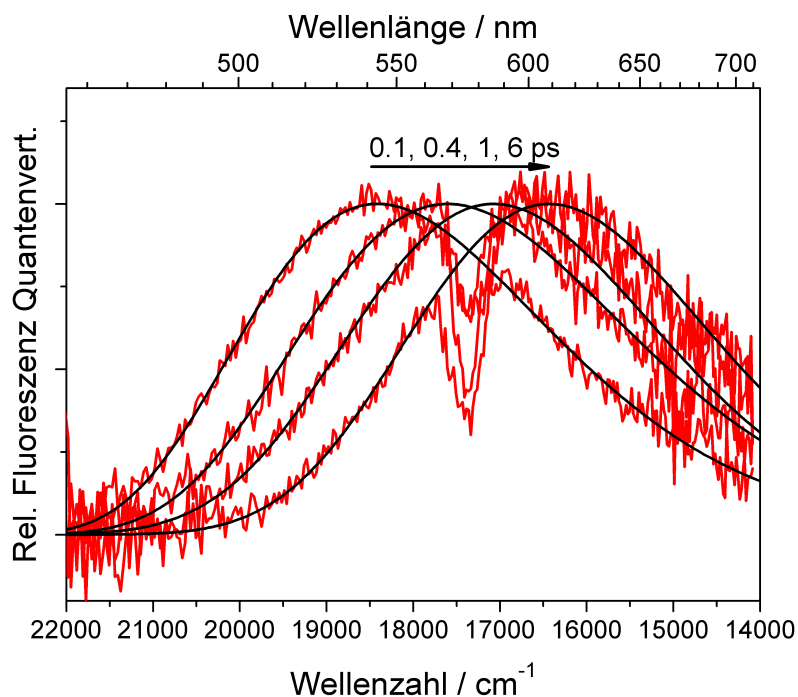
In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die Probe durch Anregung mit 400 nm Laserlicht denaturiert wird, sodass sich die Lösung nach kurzer Zeit zu einem nicht mehr untersuchbaren Gel umwandelt. Daher wurde die Pumpenergie reduziert auf etwa 0.5  $\mu\text{J}$  pro Puls, um zumindest einige Messreihen zu erhalten, bevor die Probe zerstört war. Das technische Spektrum (nicht photometrisch korrigiert) für eine Verzögerung von 2 ps ist in Abbildung 3.23 gezeigt. Störungen, zu sehen bei  $\lambda_U = 400\text{ nm}$  und  $450\text{ nm}$ , werden durch nicht aufkonvertiertes, gestreutes Pumplicht, beziehungsweise Streulicht der Harmonischen des Gates, hervorgerufen. Die Fits mit Lognormalfunktionen wurden daher mit 2–3 zusätzlichen Gauß-Termen durchgeführt. Die Erwartungswerte und Halbwertsbreiten dieser Terme wurden konstant gehalten, während die Amplituden der Gauß-Funktionen als Parameter in die Fits eingingen. Die resultierenden Lognormalfunktionen sind zusammen mit den zeitaufgelösten Fluoreszenzspektren in Abbildung 3.24 dargestellt. Es ergibt der zeitliche Verlauf der Peakposition  $\tilde{\nu}(t)$ , zu sehen in Abbildung 3.25. Da das Pumpstreulicht sich innerhalb jeder Messreihe verstärkte, konnten insgesamt je nur 5 Messreihen gemittelt werden. Es ergibt sich eine relativ hohe Standardabweichung, gerade für jeweils die letzten Spektren einer Reihe (für 4 ps-Messreihe nicht gezeigt). Das quadratische Mittel der Residuen zu einem triexponentiellen Fit ist daher relativ groß beträgt  $RMSD = 63\text{ cm}^{-1}$ . Die Fitparameter dieses Fits sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Hier wird angemerkt, dass ohne die erhöhte Aufkonversionsintensität von Case A eine Auswertung von nur 5 Messreihen wahrscheinlich nicht möglich wäre. Auffällig ist die hohe Ungenauigkeit der längsten Zeitkonstante und dessen Amplitude, welche durch die ungenaue Bestimmung des Peakmaximums gegen Ende der 200 fs-Messreihe zu erklären ist. Es ergibt sich daher auch eine hohe Ungenauigkeit für die mittlere Solvationszeit  $\tau_{solv} = 0.8 \pm 0.2\text{ ps}$ . Wird der zeitabhängige Stokes-Shift mit zwei Exponentialfunktionen gefittet entfällt diese Komponente und es ergibt sich  $\tau_{solv} = 0.71 \pm 0.03$ . Der Fehlerbereich ist hierfür wahrscheinlich größer, da die Zeitauflösung etwa 100 fs beträgt.

In beiden Fällen ergibt sich eine mittlere Solvationszeit von unter einer Picosekunde.



**Abbildung 3.23:** Gemitteltes, aufkonvertiertes Fluoreszenzspektrum von PepQ bei  $pH = 9$ , 2 ps nach Anregung aus der 200 fs-Messreihe. Die obere Skala zeigt die entsprechende Fluoreszenz Wellenzahl  $\tilde{\nu}$ . Bei etwa  $\lambda_{Up} = 400$  nm ist Streulicht des nicht aufkonvertierten gestreuten Pumplichts zu sehen. Diese wird aufgrund längerer Mittelung des Hintergrunds als negatives Signal erhalten. Zusätzlich ist in rot die photometrische Korrekturfunktion (linke Skala), sowie das Fenster, in welchem diese aufgenommen wurde dargestellt.

Verglichen mit den Ergebnissen für die anderen beiden Biosysteme (DNA 2.8 ps, Lipide 480 ps) ist diese Dynamik sehr schnell. Zum Vergleich mit der Dynamik von Bulkwasser wurde die Korrelationsfunktion  $S(t)$ , normiert bei  $S(0.3 \text{ ps}) = 1$  und  $S(20 \text{ ps}) = 0$  berechnet und zusammen mit dem entsprechenden Verlauf von MQ in  $pH = 9$  dargestellt (Abbildung 3.26). Zu sehen ist eine sehr schwache Verzögerung gegenüber der Dynamik von Bulkwasser. Dies widerspricht prinzipiell dem Modell des „biologischen“,<sup>[117]</sup> beziehungsweise „versklavten“<sup>[119]</sup> Wassers, wie bereits für unstrukturierte Bereiche von Proteinen gezeigt.<sup>[127]</sup>



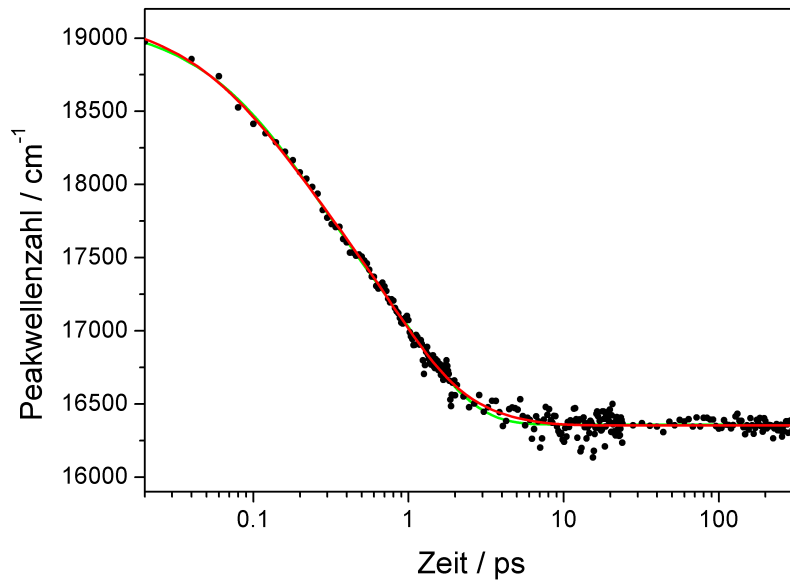
**Abbildung 3.24:** Transiente Fluoreszenzspektren von PepQ bei  $pH = 9$  (rot) und Lognormalfits (schwarz).

### 3.3.4 Solvenskontrollierter Protonentransfer

Wie bereits erwähnt, folgt der Protonentransfer der Photosäure 6-Hydroxychinolinium HQ zum Lösungsmittel der Solvatationsdynamik. Der PT zeigt also beinahe dieselbe Dynamik, was anhand transientser Absorptionmessungen von MQ in einigen Lösungsmittel gezeigt wurde.<sup>[26]</sup> Zwar wurde ein genereller Trend beobachtet, dass die langsamste Komponente des Protonentransfers für MQ immer leicht schneller als die der Solvatationsdynamik ist, allerdings war diese Abweichung sehr gering. Durch gezieltes Ausnutzen dieses Prinzips soll die Solvatationsdynamik von Wassermolekülen nahe des gleichen Modellpeptids PepQ auf einem zweiten Weg untersucht werden.

Transiente Absorptionsspektren von PepQ ( $pH = 5$ ) im Wellenlängenbereich von 308 – 724 nm wurden mithilfe des Aufbaus im Labor von Prof. Ernsting,<sup>[142,143]</sup> (beschrieben im Experimentalteil), bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm aufgenommen. Diese





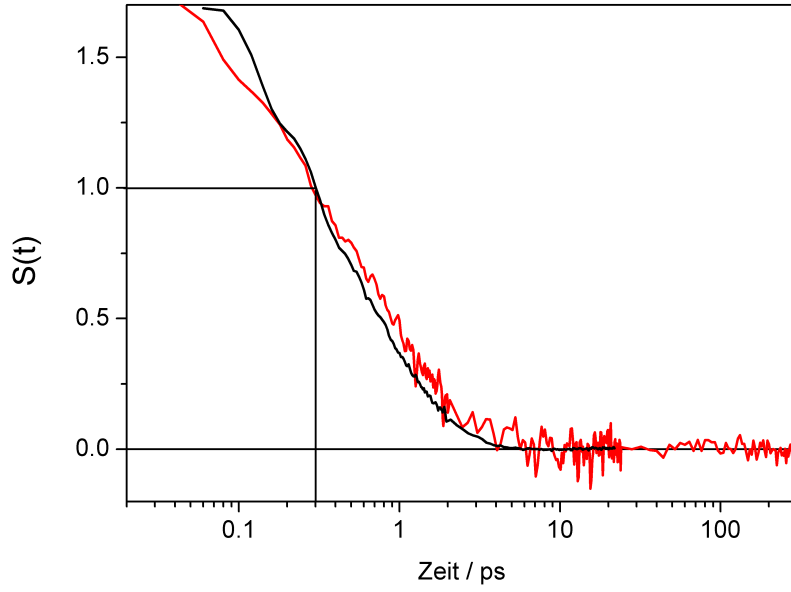
**Abbildung 3.25:** Zeitabhängiger Stokes-Shift  $\tilde{\nu}(t)$  für PepQ in wässrigem Puffer ( $pH = 9$ ) als schwarze Punkte und triexponentieller Fit (rot), beziehungsweise biexponentieller Fit (grün).

**Tabelle 3.3:** Fitparameter für Fits von  $\tilde{\nu}(t)$  mit 3 beziehungsweise 2 Exponentialfunktionen. Die Zeitauflösung betrug etwa 100 fs.

	$A_1/\text{cm}^{-1}$	$t_1/\text{ps}$	$A_2/\text{cm}^{-1}$	$t_2/\text{ps}$	$A_3/\text{cm}^{-1}$	$t_3/\text{ps}$	$A_0/\text{cm}^{-1}$
3 Exp.	$800 \pm 100$	$0.11 \pm 0.03$	$1600 \pm 200$	$0.7 \pm 0.1$	$400 \pm 300$	$2.44 \pm 1$	$16354 \pm 5$
2 Exp.	$1050 \pm 60$	$0.16 \pm 0.02$	$1720 \pm 70$	$1.05 \pm 0.04$	-	-	$16360 \pm 4$

Spektren sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Sie setzen sich zusammen aus Absorption angeregter Zustände (*excited state absorption*, ESA) als positive Anteile, und Ausbleichen des Grundzustands (*bleach*, BL), sowie stimulierter Emission SE. BL und SE bilden negative Anteile in den transienten Absorptionsspektren, z.B. bei  $\sim 360$  nm, bzw.  $\sim 650$  nm.

Gut zu sehen, jedoch teilweise von ESA überlagert, ist der verzögerte Anstieg der SE-Bande des Zwitterions (Z-Bande) bei  $\sim 650$  nm. Die SE-Bande des Kations (C-Bande bei  $\sim 470$  nm) ist vollständig von ESA überlagert. Um diese Banden zu extrahieren, wur-



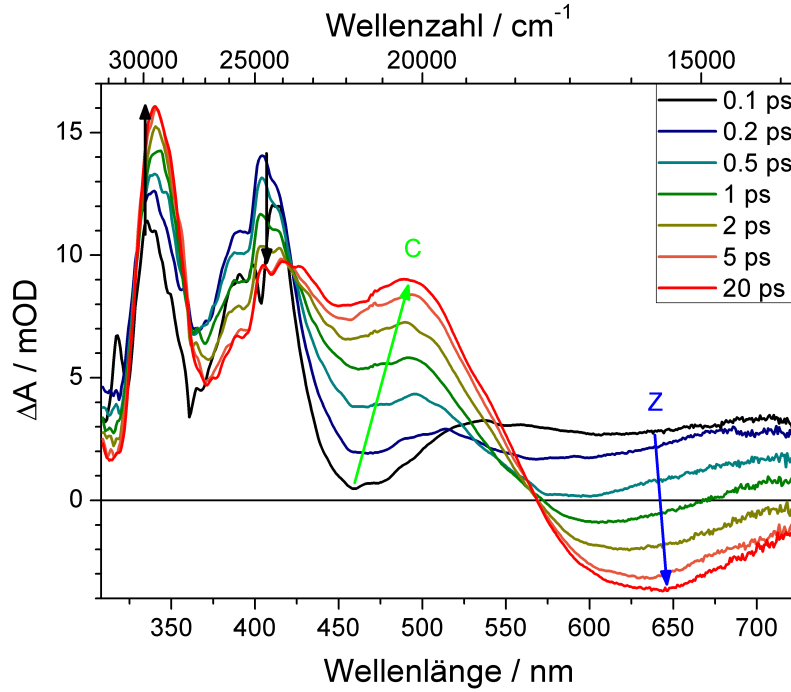
**Abbildung 3.26:** Vergleich der Solvatationsdynamik von MQ (schwarz) und PepQ (rot), jeweils bei  $pH = 9$ . Dafür wurden die zeitabhängigen Stokes-Shifts  $\tilde{\nu}(t)$  jeweils bei 0.3 ps und 20 ps normiert um die Verläufe von  $S(t)$  zu erhalten.

den die transienten Absorptionsspektren zerlegt, um eine als konstant angenommene, stationäre ESA zu erhalten. Dieses Verfahren wurde bereits in der Literatur beschrieben.<sup>[21,26,95,144,145]</sup>

Zunächst wurde ein gemeinsames Spektrum für den stationären BL und die stationäre SE erzeugt. Dazu wurde das extern gemessene, stationäre Absorptionsspektrum (siehe Abbildung 3.22) auf sein Maximum normiert und mit -1 multipliziert um den BL zu erhalten. Die  $S_1 \leftarrow S_0$ -Bande  $\sigma_{10}$  wurde durch Lognormalfits extrahiert und für diese wurde das entsprechende quadrierte Übergangsdipolmoment  $M^2$  bestimmt.

$$M^2 = \int \sigma_{10}/\tilde{\nu} \, d\tilde{\nu} \quad (3.6)$$

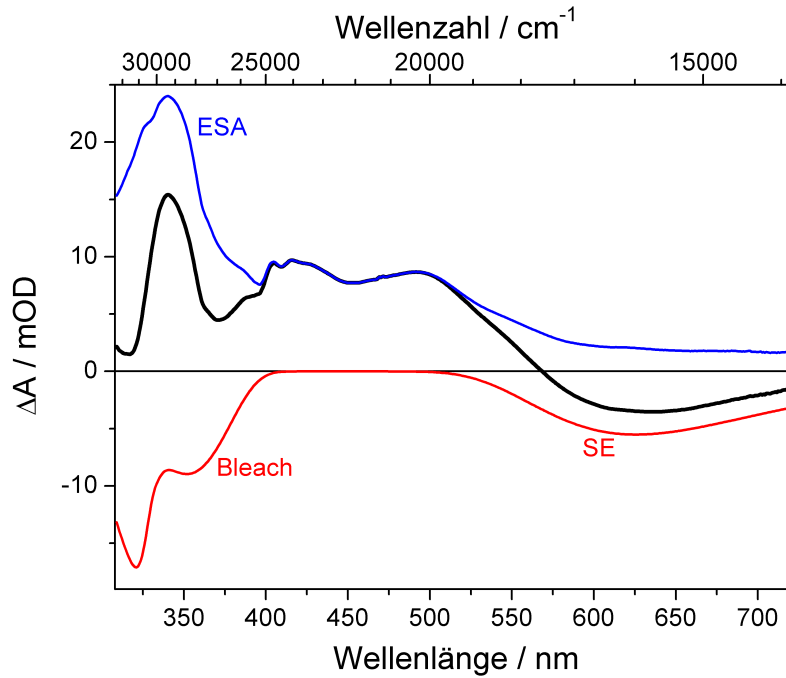
Die stationäre Fluoreszenzbande in der Wellenzahldomäne wurde erneute Division durch  $\tilde{\nu}^2$  in die stationäre stimulierte Emissionsbande überführt und auf dasselbe  $M^2$  normiert. Dadurch erfolgte die relative Skalierung von Absorption und stimulierter Emission, da der



**Abbildung 3.27:** Transiente Absorptionsspektren von PepQ bei  $pH = 5$  nach Anregung bei 360 nm. Beide SE-Banden (C-Bande bei  $\sim 470$ ; Z-Bande  $\sim 650$  nm) werden durch ESA überlagert.

Übergang zwischen den gleichen Zuständen betrachtet wird. Es ergibt sich das Probespektrum  $\sigma_{AbsSE}$ , welches in Abbildung 3.28 in rot dargestellt ist. Dieses Probespektrum wird von einem Mittel von transienten Absorptionsspektren ( $10 \text{ ps} \leq t < 100 \text{ ps}$ , schwarz in Abbildung 3.28) subtrahiert um die stationäre ESA zu erhalten (blau). Der relative Faktor, mit welchem  $\sigma_{AbsSE}$  skaliert werden muss, wird dabei so bestimmt, dass die entstandene Differenz auf allen Wellenzahlen positiv ist. Die erhaltene stationäre ESA wird als konstant angenommen und von allen transienten Absorptionsspektren abgezogen, sodass die zeitabhängigen stimulierten Emissionsspektren erhalten werden, welche in Abbildung 3.29 dargestellt sind.

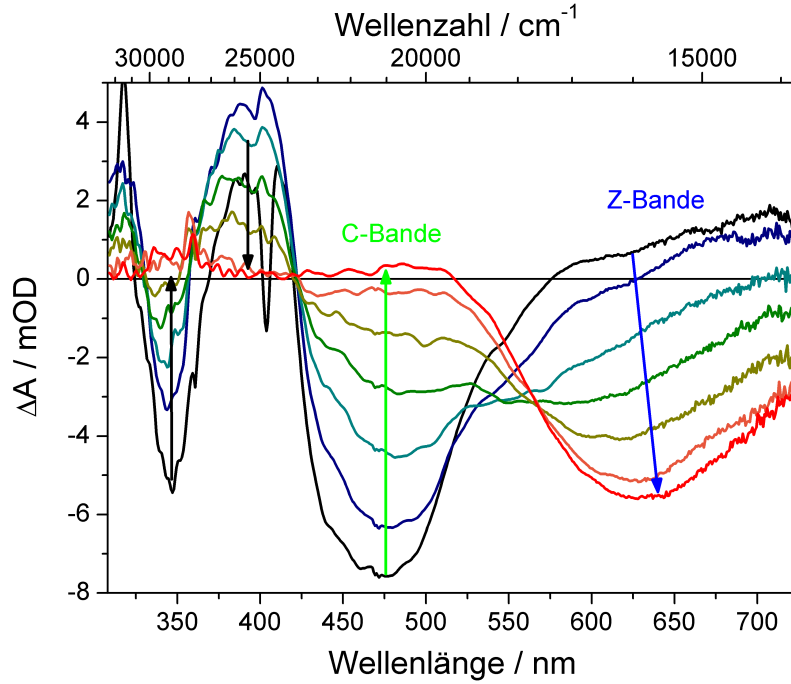
Sowohl C- wie auch Z-Bande sind nun deutlich zu sehen. Mit zunehmender Zeit nimmt die C-Bande ab, während die Z-Bande ansteigt und zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben wird. Die Z-Bande beginnt nahezu bei 0 mOD. Die C-Bande erreicht diesen Wert bei 20 ps.



**Abbildung 3.28:** Spektrale Zerlegung eines gemittelten Absorptionsspektrums (schwarz, Mittelung über  $10\text{ ps} \leq t < 100\text{ ps}$ ). Bleach und SE wurden aus stationären Messungen erhalten und auf das quadrierte Übergangsdipolmoment des Übergangs  $S_1 \leftarrow S_0$  normiert. Multiplikation mit einem empirischen Faktor und Subtraktion vom gemittelten Spektrum ergibt die stationäre ESA (blau).

Dies ist ein Indiz dafür, dass die Annahme der Konstanz der ESA gültig ist im betrachteten Wellenlängenbereich. Abweichung sind unterhalb von 425 nm zusehen.

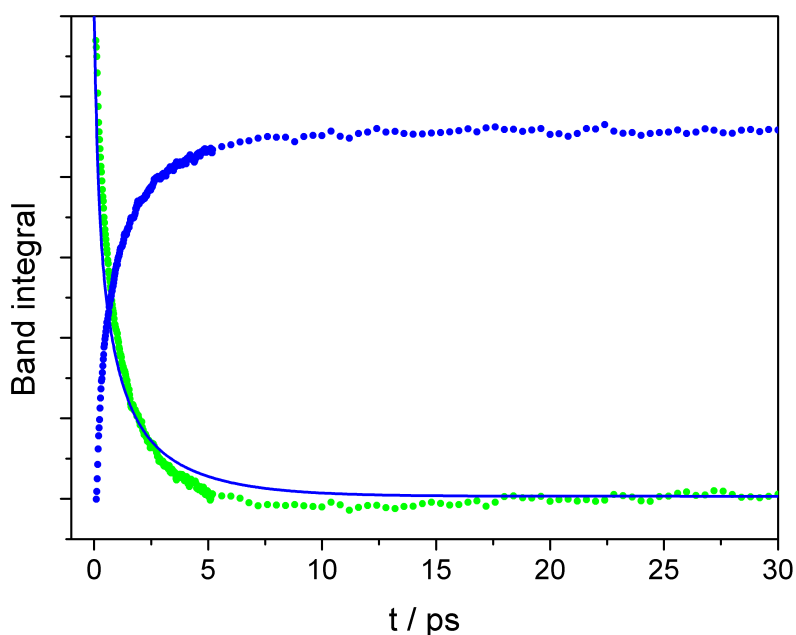
Prinzipiell kann anhand des zeitabhängigen Stokes-Shifts der Z-Bande ebenfalls die Solvatationsdynamik beobachtet werden.<sup>[21,26]</sup> Da sich die Z-Bande aber erst mit der Zeit aufbaut, wurden hier die Bandintegrale  $BI(\lambda_1, \lambda_2)$  der beiden stimulierten Emissionsbanden in geeigneten Grenzen betrachtet, um den zeitabhängigen Protonentransfer zu erhalten. Der zeitliche Verlauf ist in Abbildung 3.30 dargestellt. Zum direkten Vergleich der beiden Dynamiken wurde ein exponentieller Fit der Z-Bande mit -1 multipliziert und verschoben.



**Abbildung 3.29:** Zeitabhängige stimulierte Emissionsspektren von PepQ ( $pH = 5$ ), erhalten durch Subtraktion der stationären ESA von allen transienten Absorptionsspektren. Gezeigt sind Spektren von 0.1 (schwarz) bis 20 ps (dunkelblau). Für die Zuordnung der weiteren Farben, siehe Legende in Abbildung 3.27.

$$BI(\lambda_1, \lambda_2) = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \Delta A / \lambda \, d\lambda \quad (3.7)$$

Zu frühen Verzögerungen erscheint die Dynamik der Z-Bande schneller, ab ca. 2 ps langsamer zu sein als die der C-Bande. Da sich die Z-Bande mit zunehmender Zeit teilweise aus dem detektierten Wellenlängenbereich verschiebt, kann letzteres zumindest teilweise erklärt werden. Ab etwa 50 ps steigt das BI der C-Bande erneut an, was wahrscheinlich auf die sinkende Population im angeregten Zustand und damit auf eine Abnahme der als konstant angenommenen ESA zurückzuführen ist. Jedoch ist die Dynamik beider Banden relativ ähnlich und es ist keine langsame Dynamik zu erkennen, was die Ergebnisse aus den Fluoreszenzmessungen bestätigt.

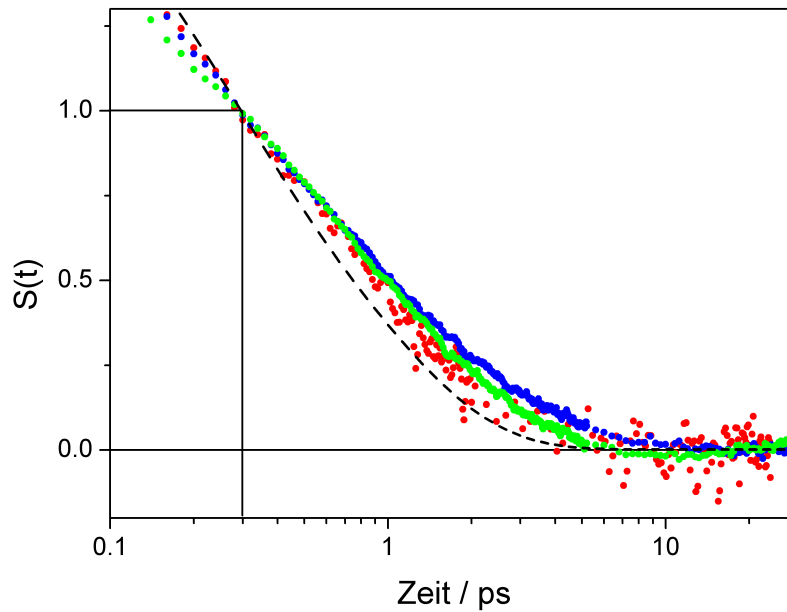


**Abbildung 3.30:** Die Bandintegrale der C- (grün, 426-535 nm) und Z-Bande (blau, 554-712 nm). Zum Vergleich wurde der exponentielle Fit für die Z-Bande mit -1 multipliziert und ebenfalls dargestellt als blaue Linie.

Für den direkten Vergleich der Ergebnisse von transienter Absorption und Fluoreszenz wurden auch für die Bandintegrale die Korrelationsfunktionen  $S(t)$  gebildet. Zusammen mit dem bereits in Abbildung 3.26 dargestellten Verlauf für die FLUPS-Messungen ist in Abbildung 3.31 zu sehen, dass beide Techniken die gleiche, schnelle Dynamik ergeben.

Damit wurde gleichzeitig gezeigt, dass der Chromophor Q weitläufiger einsetzbar ist, um die Umgebungsdynamik einer Matrix zu bestimmen, als andere Polaritätssonden. Wenn eine Anregung nahe 400 nm beispielsweise nicht möglich ist, da die Matrix eine Absorptionsbande in diesem Bereich aufweist, oder die Matrix bei höheren pH-Werten instabil ist, kann auf die lichtinduzierte Protonierungsdynamik zum Solvens in saurer Lösung zurückgegriffen werden.

Da ebenfalls polarisationsaufgelöste transiente Absorptionsmessungen durchgeführt wur-



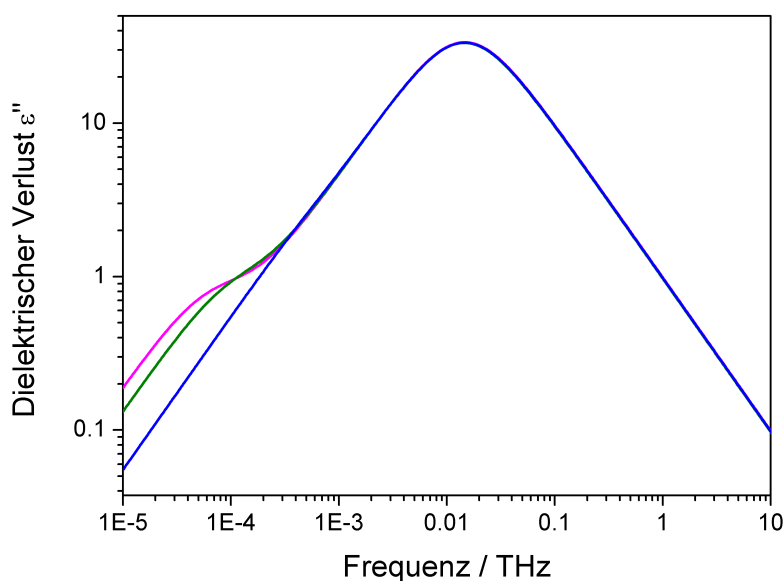
**Abbildung 3.31:**  $S(t)$ -Kurven, berechnet aus den Fluoreszenz-Peakpositionen  $\tilde{\nu}(t)$  (rot), sowie den Bandintegrale der C- (grün) und Z-Bande (blau, multipliziert mit -1) für PepQ in Wasser. Sie zeigen eine gute Übereinstimmung und eine nur leicht verzögerte Dynamik im Vergleich zu der von MQ in Wasser, deren exponentieller Fit gestrichelt dargestellt ist.

den, konnte auch der Anisotropieabfall bestimmt werden. Für die Wellenlängenbereiche der beiden stimulierten Emissionen ergaben sich Rotationszeiten von  $120 \pm 5$  ps.

### 3.3.5 Diskussion

Dieses Projekt wurde in Kooperation mit Julius Schulz aus der Arbeitsgruppe Prof. Netz von der Freien Universität zu Berlin bearbeitet.<sup>[146]</sup> Sie führten MD-Simulationen von Modellpolypeptiden für  $\alpha$ -Helices in Wasser aus und berechneten daraus dielektrische Spektren  $\epsilon(\nu)$ . Neben dem bereits beschriebenen Salzbrückenpeptid Pep Ac-AEAAAKE-AAAKEAAKA-NH<sub>2</sub> wurden auch Polyalanin Ala<sub>17</sub> und Polyglutamin Gln<sub>17</sub> untersucht, sowie abschließend direkt das markierte PepQ (mit deprotonierter Oxy-Gruppe am Chromophor). Die Ergebnisse sollen hier kurz zusammengefasst werden.

Zunächst wurden die Abweichungen der Rückgrate der drei Peptide zu einer perfekten

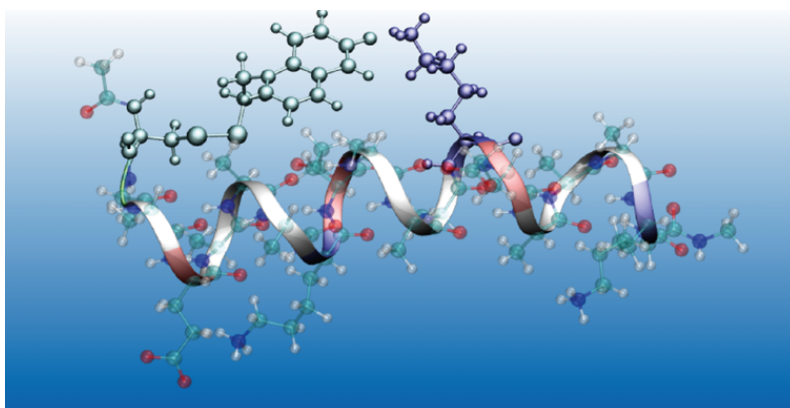


**Abbildung 3.32:** Dielektrische Verlustspektren von Wasser aus den Simulationen von Ala<sub>17</sub> (magenta), Gln<sub>17</sub> (grün) und des Salzbrückpeptids Pep (blau). Für Pep wurde kein langsames Wasser (bei  $\sim 10^{-4}$  THz) beobachtet.

Helix an jedem Zeitpunkt berechnet. Alle Peptide wiesen stabile Helices auf und lagen die meiste Zeit in gefalteten Zuständen vor. Ungefaltete Zustände traten auf, jedoch in so kleinem Ausmaß, dass sie nicht zu den dielektrischen Spektren beitrugen, wie etwa bei einem anderen Modellpeptid beobachtet wurde.<sup>[147]</sup> Die stabilste Helix wurde dabei von Polyglutamin gebildet.

Aus Dipol-Dipol-Autokorrelationsfunktionen wurden die dielektrischen Spektren  $\epsilon(\nu)$  ermittelt und zerlegt in die jeweiligen Anteile von Wasser und Peptid, wobei die Anteile des Peptids sehr gering waren. Für das Salzbrückenpeptid Pep ergab sich interessanterweise, dass keine ausgeprägte Absorption im Bereich von  $10^{-4}$  THz zu beobachten war. Diese Absorption wäre langsamen, gebundenen Wassermolekülen zuzuordnen. Die Fits mit 2 Debye-funktionen der dielektrischen Verlustspektren sind in Abbildung 3.32 dargestellt. Die anderen beiden Helices weisen „versklavtes“ Wasser auf, nur Pep nicht. Dies wurde dem geringen effektiven Dipolmoment des Peptids zugeordnet, da das Dipolmoment des Rückgrats fast vollständig durch das der Seitengruppen ausgelöscht wird.





**Abbildung 3.33:** Momentaufnahme aus MD-Simulationen von PepQ. Der Chromophor Q ist zeitweise an eine Lysin-Seitenkette gebunden (erstes Minimum).<sup>[146]</sup>

Ebenfalls wurde das markierte Polypeptid PepQ in Wasser simuliert, sowohl für den Grundzustand des Chromophors, als auch für den angeregten Zustand. Für den Grundzustand zeigt sich, dass die Einführung des Chromophors die Helix nicht stört, sondern eher stabilisiert. Der Chromophor zeigt dabei die Tendenz Wasserstoffbrücken mit den Seitenketten zu bilden. Wird der Abstand des Sauerstoffatoms zu einem beliebigen Atom der Helix als Variable genommen, ergeben sich drei Minima der freien Energie. Das erste Minimum stellt eine Bindung zu einer Lysin-Seitenkette dar (siehe Abbildung 3.33). Das zweite und dritte Minimum wird durch teilweise, beziehungsweise durch komplett entfaltete Zustände gebildet. Die dielektrischen Spektren von Peptid und Wasser bleiben nahezu unbeeinträchtigt durch die Einführung des Chromophors.

Im angeregten Zustand ist das erste Minimum der freien Energie entlang des Sauerstoff-Seitenketten-Abstands deutlich schwächer ausgeprägt, wahrscheinlich aufgrund der geringeren Elektronendichte am Chromophor-Sauerstoff. Dagegen ist das zweite Minimum, welches partieller Entfaltung entspricht, deutlich stärker ausgeprägt. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich PepQ entfaltet, ist also laut MD-Simulationen deutlich höher, als im Grundzustand. Dies könnte eine Erklärung für die beobachtete Denaturierung bei der hohen Anregungsenergie während der FLUPS-Messungen sein. Warum diese Denaturierung bei

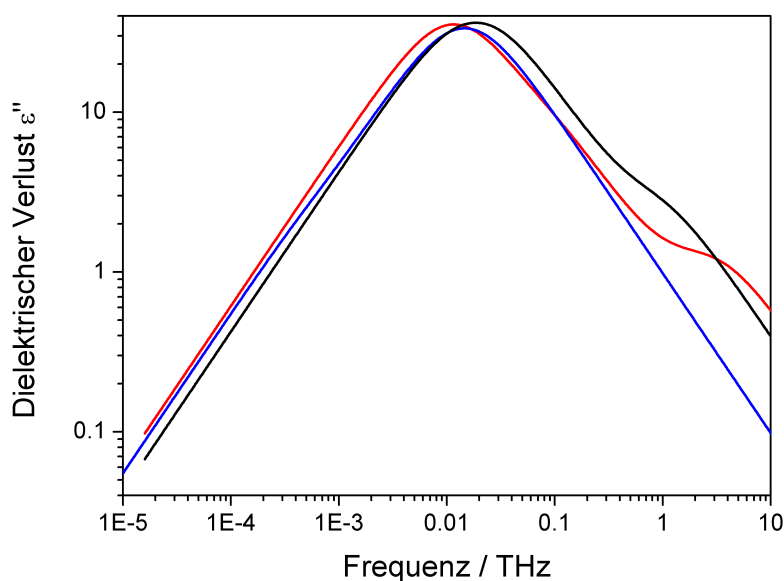
ähnlicher Pumpenergie in den transienten Absorptionsmessungen nicht auftrat, könnte durch weitere MD-Simulationen mit dem protonierten Chromophor aufgeklärt werden.

Für den direkten Vergleich zwischen Simulation und Experiment wurde aus dem zeitabhängigen Stokes-Shift das lokale dielektrische Verlustspektrum in der Nähe des Chromophors berechnet. Dies wurde durchgeführt, wie in der Literatur ausführlich beschrieben<sup>[13,22]</sup> und in Abschnitt 1.2 angedeutet, indem eine Fitfunktion  $R(t)$  für  $\tilde{\nu}(t)$  mit Parametern einer Debye-Relaxation angepasst wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.34 gezeigt. Zusätzlich ist auch das entsprechende dielektrische Verlustspektrum für MQ in Wasser dargestellt, welches aus Präzisionsmessungen erhalten wurde (siehe Abschnitt 3.4). Im Vergleich zu diesem ist das Spektrum für PepQ leicht verschoben zu geringeren Frequenzen. Dies entspricht der bereits in Abbildung 3.26 gezeigten, relativ schwachen Retardation der Dynamik. Die Übereinstimmung mit dem Spektrum für Wasser aus den Simulationen ist recht gut.

Es ergibt sich also, dass die Umgebungsdynamik von Peptiden nicht allein von der Sekundärstruktur abhängt, wie zuvor von King *et al.* vorgeschlagen,<sup>[127]</sup> sondern viel mehr vom effektiven Dipolmoment des Peptids.

#### 3.3.6 Zusammenfassung

Es wurde die Solvatationsdynamik um ein markiertes Modellpolypeptid, welches mithilfe von Salzbrücken in Wasser eine  $\alpha$ -Helix bildet, untersucht. Neben dem zeitabhängigen Stokes-Shift aus FLUPS-Messungen wurde dazu auch die Dynamik des solvenskontrollierten Protonentransfers der starken Photosäure HQ herangezogen. Das Fehlen einer langsamen Komponente in beiden Fällen konnte mittels MD-Simulationen eines Kooperationspartners dem geringen effektiven Dipolmoment des Salzbrücken-Peptids zugeordnet werden.



**Abbildung 3.34:** Dielektrische Verlustspektren, berechnet aus dem zeitabhängigen Stokes-Shift für PepQ (rot) und MQ (schwarz). In blau ist das entsprechende Spektrum für Wasser um PepQ, berechnet aus MD-Simulationen von J. Schulz gezeigt.

## 3.4 Hydrophobe Gruppen

Teilweise analog zu Quelle 148

### 3.4.1 Literaturüberblick

Das Verhalten von Wassermolekülen nahe einer unpolaren Gruppe ist direkt verbunden mit biologischen Interaktionen und Funktionen.<sup>[5]</sup> Interessanterweise ist eine einheitliche Beschreibung dieser grundsätzlichen Solvationsdynamik noch nicht gefunden.

1945 wurde von Frank und Evans ein signifikanter Abfall der Entropie bei höheren Temperaturen von Edelgasen in wässrigen Lösungen beobachtet. Sie schlugen daraufhin das „Eisberg“-Modell vor, wonach Wassermoleküle einen Eis-artigen Käfig um unpolare Atomgruppen bilden. Dieses Modell wurde in den 1990er Jahren angezweifelt, da in Neutronenstreuungs-Experimenten der gleiche Sauerstoff-Sauerstoff-Abstand von Solvationswasser, wie in Bulkwasser gefunden wurde.<sup>[149]</sup> Ebenso wurden in NMR-Studien nur schwache

Effekte auf die Rotationsdynamik von Wasser nahe Xenon-Molekülen beobachtet.<sup>[150]</sup>

Neu entfacht wurde die Diskussion durch polarisationsaufgelöste fs Infrarot-Experimente an konzentrierten wässrigen Lösungen ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Mischung) von Amphiphilen wie Tetramethylharnstoff (TMU) und Trimethylamin-N-Oxid (TMAO).<sup>[17,151–155]</sup> Nichtverschwindende Plateaus des Anisotropieabfalls der O-D-Streckschwingung wurden als immobilisiertes Wasser nahe der Methylgruppen interpretiert, mit einem Retardationsfaktor von 4 im Vergleich zu Bulkwasser. Die Lebensdauer des angeregten Zustands der beobachteten Schwingung betrug dabei allerdings nur 2 ps, sodass das beobachtbare Zeitfenster kleiner als 10 ps ist. Da diese Plateaus bei Temperaturen oberhalb von 65 °C verschwanden<sup>[154]</sup> wurde geschlossen, dass der von Laage und Mitarbeitern vorgeschlagene Volumenausschlusseffekt<sup>[9,132,156–159]</sup> nicht Ursache der Beobachtungen sein kann.

Das Modell des Volumenausschlusses basiert auf Ergebnissen von MD-Simulationen. Der allgemeine Wasser-Reorientierungsprozess wird als ein großer Winkelsprung zu einem Wasserstoffbrückenpartner der zweiten Solvatationssphäre beschrieben.<sup>[7,8]</sup> Die Interaktion des unpolaren gelösten Stoffes beschränkt sich dabei lediglich auf ein Blockieren des Raumes, von dem der neue Partner herankommen kann. Da dieses blockierte Volumen bei konvexen unpolaren Gruppen maximal die Hälfte des gesamten Raumes darstellen kann, ist auch der Retardationsfaktor auf den Wert 2 gedeckelt.

Auch hier ist also die Größenordnung der Verlangsamung der Wasserdynamik durch gelöste Stoffe eine zentrale Frage. In anderen Simulationen wurden Hinweise für<sup>[160–162]</sup> und gegen<sup>[163–165]</sup> stark verlangsamte, Eis-artige Solvatationshüllen gefunden.

Experimente auf diesem Gebiet können allgemein in zwei verschiedene Herangehensweisen geordnet werden. Im ersten Ansatz kann die verwendete Observable nicht zwischen Bulk- und Hydratationswasser unterscheiden.<sup>[16,150,154,166–173]</sup> Eine Variation des Stoffmengenanteils des gelösten Stoffs ist benötigt, um eine Observable zu extrahieren, die mit dessen Solvatationssphäre korreliert. Das Hydratationswasser wird also nur indirekt beobachtet.

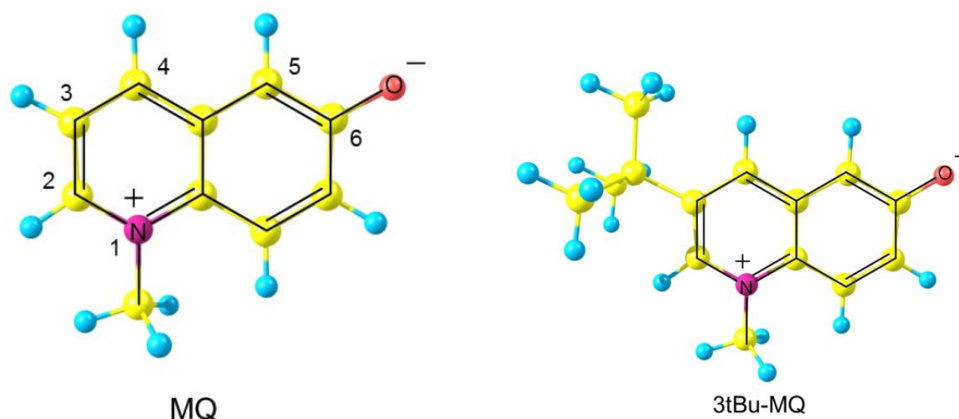
Beispiele hierfür sind, neben der bereits erwähnten Messung des Anisotropieabfalls der O-D-Streckschwingung, thermodynamische Methoden, wie die Messung von Wärmekapazitäten von Amphiphilen in wässrigen Lösungen.<sup>[172,173]</sup>

Im zweiten Ansatz ist die Observable ausschließlich sensibel auf Hydratationswasser und kann daher Bulkwasser als Quelle ausschließen.<sup>[17,149,174,175]</sup> Beispiele hier sind gesonderte Banden in Ramanspektren von Alkohollösungen,<sup>[174]</sup> oder C-H-Korrelationsfunktionen aus den genannten Neutronenstreuungsexperimenten.<sup>[149]</sup> In diesem Ansatz ist es nicht mehr erforderlich die Konzentration des gelösten Stoffs zu verändern, dies kann jedoch durchgeführt werden um die Sensibilität zu erhöhen.<sup>[174]</sup>

Ein Problem auf diesem Gebiet ist das Einbringen von unpolaren, hydrophoben Gruppen zu relativ hohen Stoffmengenanteilen in das stark polare Lösungsmittel Wasser. In den meisten Fällen wird dieses Problem überwunden, indem Amphiphile verwendet werden, also Stoffe mit hydrophoben und hydrophilen Gruppen. Eine Herausforderung jeder Arbeit sollte es dabei sein, zu beweisen, dass beobachtete Effekte rein auf das Umgebungswasser des unpolaren Teils zurückzuführen sind. Dies gelingt zum Beispiel durch systematische Variation des gelösten Stoffes.<sup>[170,174]</sup>

Es bleibt das Problem der hohen Konzentration. Beispielsweise soll TMAO, das am meisten untersuchte Amphiphil, auf diesem Gebiet betrachtet werden. Wenn sich in der ersten Solvatationssphäre über 20 Wassermoleküle befinden,<sup>[156]</sup> so reicht nicht einmal eine Verdünnung von 100:1 aus um reine Solvationsdynamik zu beobachten, da die Solvationshüllen überlappen. Zusätzlich können höhere Konzentrationen von Amphiphilen zur Clusterbildung führen.<sup>[176]</sup>

Wie bereits mehrmals in dieser Arbeit gezeigt, eignen sich fs-Fluoreszenzexperimente sehr gut, um die Solvationsdynamik von verdünnten wässrigen Lösungen zu untersuchen.<sup>[10,13,19,177,178]</sup> Auf dem Gebiet der hydrophoben Solvationsdynamik gibt es jedoch lediglich eine Arbeit, deren Ergebnisse auf dieser Methode basieren. Es wurde dabei Cumarin 480 in Alkohol-Wasser-Mischungen mit Typ-1-Aufkonversion gemessen (300 fs



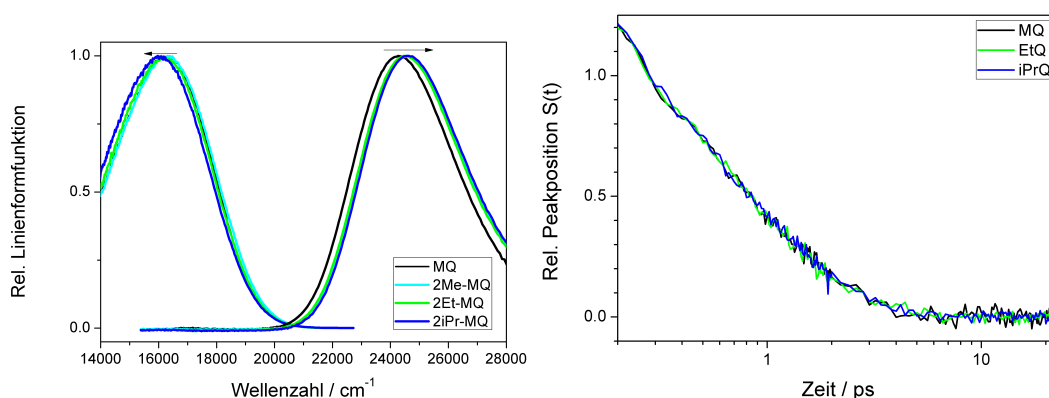
**Abbildung 3.35:** Struktur von N-Methyl-6-Oxychinolinium Betain MQ (links) aus DFT-Rechnungen von Ilya Ioffe und Beschriftung der Kohlenstoffatome.<sup>[148]</sup> Rechts gezeigt ist das Derivat 3tBu-MQ, welches eine *tert*-Butylgruppe an der Position 3 trägt.

Zeitauflösung). Dies ist daher dem ersten, ungeeigneten Ansatz zuzuordnen, da nicht ausschließlich Hydratationswasser der unpolaren Anteile (hydrophobe Gruppen in Alkoholen) gemessen wurden.

Für Biomoleküle wurden zahlreiche Untersuchungen lokaler Solvatationsdynamik über den zeitabhängigen Stokes-Shift vorgestellt.<sup>[13,84,121]</sup> Diese Biomoleküle wurden dabei an speziellen Stellen mit der Polaritätssonde markiert. Dass diese Methode auf dem hier diskutierten Gebiet noch nicht erfolgte, hat vermutlich zwei Gründe.

Zum einen muss die Löslichkeit des Chromophors gegeben sein. Fluoreszenzfarbstoffe bestehen in der Regel aus aromatischen Kohlenwasserstoff-Grundgerüsten mit polaren Gruppen. Werden nun zusätzlich unpolare Gruppen eingeführt, so sinkt die Löslichkeit in Wasser erheblich.

Zum anderen stellt die Einführung einer unpolaren Gruppe für einen Chromophor nur eine sehr geringe Änderung dar. Der zeitabhängige Stokes-Shift wurde bislang als unabhängig von der Geometrie der Polaritätssonde angesehen, wie zum Beispiel in Quelle 23



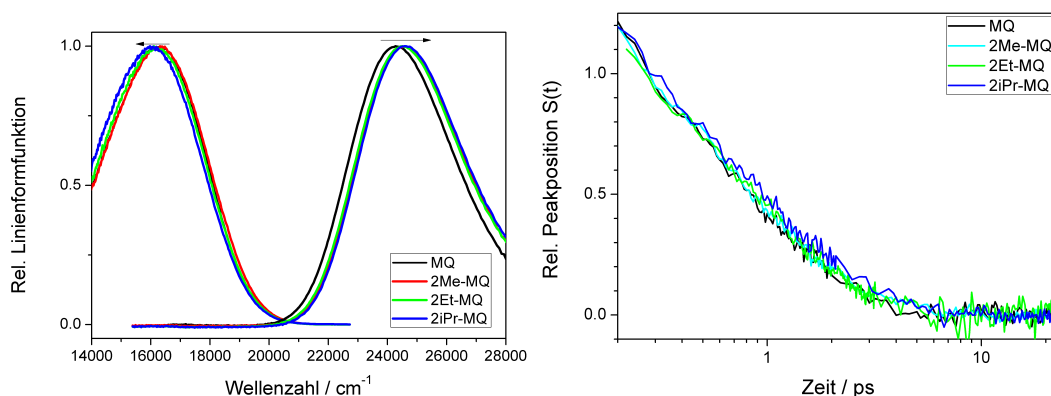
**Abbildung 3.36:** Linienformfunktionen, berechnet aus Absorption und Fluoreszenz für MQ und am Stickstoffatom substituierte Derivate (links) in wässriger Lösung ( $pH = 9$ ). Rechts ist der normierte TDSS ( $S(t)$ ) aus FLUPS-Messungen für diese Farbstoffe gezeigt.

dargelegt. Grund hierfür ist aber, dass die temporale und spektrale Auflösung nicht ausreichte, um systematische Unterschiede aufzudecken. Signifikante Farbstoffabhängigkeit der Dynamik in anderen Lösungsmitteln wurde unterschiedlichem Wasserstoffbrückenbindungsverhalten<sup>[177–180]</sup> oder Rotationsdiffusion der Farbstoffe auf der gleichen Zeitskala wie die Solvatationsdynamik zugeordnet.

Der bereits mehrmals in dieser Arbeit verwendete Farbstoff N-Methyl-6-oxychinolinium Betain MQ ist aufgrund des zwitterionischen Grundzustands sehr gut in Wasser löslich, sodass eine unpolare Substitution an verschiedenen Stellen die Löslichkeit nicht verhindert. In diesem Abschnitt sollen daher Derivate dieser Verbindung untersucht werden, welche unpolare Gruppe tragen.

### 3.4.2 Aliphatisch substituierte Chinoline

In diesem Projekt wurden von Celin Richter Chinoline synthetisiert, welche aliphatische Gruppen an verschiedenen Stellen des Chromophors Q tragen. Am Stickstoffatom, sowie an den Kohlenstoffatomen 2 und 3 konnten Methyl- (Me), Ethyl- (Et) und *iso*-Propylgruppen (iPr) eingeführt werden. Zusätzlich konnte an der Position 3 auch eine *tert*-Butylgruppe (tBu) beziehungsweise eine Adamantylgruppe substituiert werden. Die Löslichkeit für



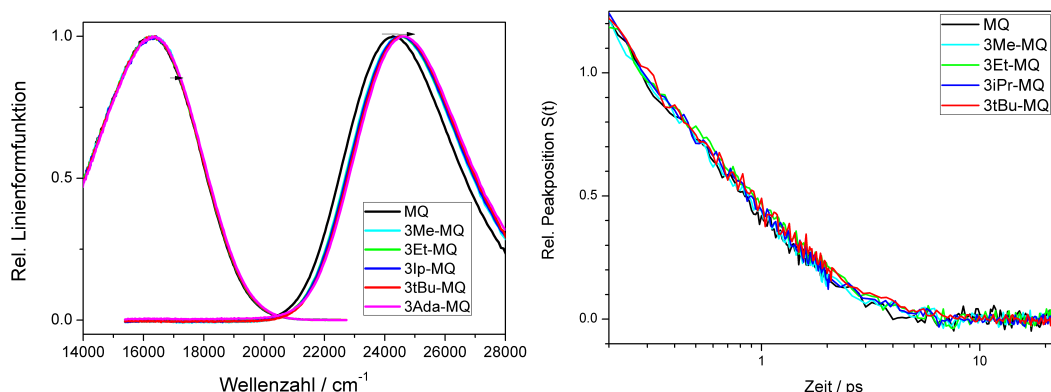
**Abbildung 3.37:** Linienformfunktionen, berechnet aus Absorption und Fluoreszenz für MQ und Derivate, substituiert am Kohlenstoffatom 2 (links) in wässriger Lösung ( $pH = 9$ ). Rechts ist der normierte TDSS ( $S(t)$ ) aus FLUPS-Messungen für diese Farbstoffe gezeigt.

3Ada-MQ war allerdings nicht mehr ausreichend für FLUPS-Messungen, bei welchen höhere Konzentrationen benötigt werden. Die Strukturen von MQ und 3tBu-MQ sind in Abbildung 3.35 gezeigt.

Zunächst wurden stationäre Absorptions- und Fluoreszenzmessungen für alle 11 Chinoline durchgeführt. Um die stationären Stokes-Verschiebungen zu bestimmen, wurden diese Spektren zu Linienformfunktionen umgewandelt, indem die Fluoreszenzquantenverteilung gegen Wellenlängen mit  $\lambda^5$  und die Absorption mit  $\lambda$  multipliziert wurde. Diese Spektren sind in den Abbildungen 3.36, 3.37, 3.38 jeweils links dargestellt. Aus der Differenz der Peakpositionen der Fits mit einer Lognormal-Funktion (Gleichung 2.17) der  $S_1 \leftarrow S_0$ -Bande wurden die stationären Stokes-Shifts erhalten. Die Peakpositionen für Absorption und Emission, wie auch die Stokes-Verschiebungen sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Die Ausgangsverbindung MQ weist den geringsten Stokes-Shift auf, wahrscheinlich da es im Vergleich zu den anderen Chinolinen keine zusätzlichen aliphatischen Gruppen mit positivem induktiven Effekt trägt. Daher ist es auch plausibel, dass eine Substitution am Stickstoffatom einen geringeren Effekt zeigt, als die Substitution eines Wasserstoffatoms in Position 2 oder 3. Die Absorptionsspektren der an diesen Positionen substituierten Chi-





**Abbildung 3.38:** Linienformfunktionen, berechnet aus Absorption und Fluoreszenz für MQ und Derivate, substituiert am Kohlenstoffatom 3 (links) in wässriger Lösung ( $pH = 9$ ). Rechts ist der normierte TDSS ( $S(t)$ ) aus FLUPS-Messungen dieser Farbstoffe gezeigt.

noline sind verschoben um  $\sim +300 \text{ cm}^{-1}$  im Vergleich zu MQ. Ein ähnlicher Effekt wurde in den NMR-Spektren beobachtet. Die aromatischen Signale sind um  $\sim 0.1 \text{ ppm}$  Hochfeldverschoben im Vergleich zu denen von MQ. Eine Substitution der *N*-Methylgruppe zeigt eine vernachlässigbare Verschiebung (nicht gezeigt).

Interessanterweise zeigen die Emissionsspektren der an Kohlenstoffatom 2 substituierten Farbstoffe eine Rotverschiebung, welche mit der Größe der aliphatischen Gruppe ansteigt, wodurch diese Chinoline die größten Stokes-Shifts aufweisen. Die Peakpositionen von den Emissionsspektren der 3-Serie sind nahezu unabhängig von der Größe. Dies könnte zusammenhängen mit der Orbitalstruktur des HOMO und LUMO von Q.<sup>[28]</sup> Während am C-2-Atom sehr große Orbitallappen in beiden Zuständen vorliegen, sind sie sehr klein an C-3. Daher könnte eine Änderung des induktiven Effekts an der Position 2 einen höheren Einfluss haben.

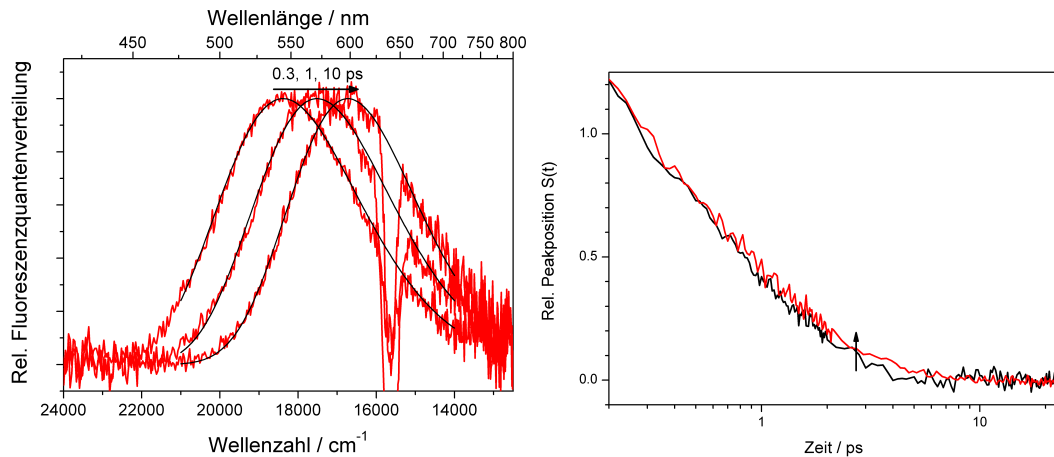
Bis auf 3Ada-MQ konnten alle Chinoline mit FLUPS in wässrigen Lösungen gemessen werden. Für 3tBu-MQ sind die zeitaufgelösten Spektren beispielhaft in Abbildung 3.39 links gezeigt. Die Spektren wurden mit Lognormalfunktionen gefittet, die erhaltenen zeitabhängigen Peakpositionen wurden mit triexponentiellen Funktionen gefittet um die mittleren Solvatationszeiten  $\tau_{\text{solv}}$  zu erhalten. Diese sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Zum

**Tabelle 3.4:** Peakpositionen aus Lognormalfits der Linienformfunktion von Absorption (Max. Abs.) und Emission (Max. Em.), sowie deren Differenz der stationäre Stokes-Shift (Stat. SS) für alle gemessene Chinoline. Außerdem sind die mittleren Solvatationszeiten  $\tau_{solv}$ , berechnet aus triexponentiellen Fits des TDSS, gezeigt. Bei 3Ada-MQ war die Löslichkeit nicht ausreichend für FLUPS-Messungen. Die Fehlerbereiche für die Solvatationszeiten liegen bei 20-200 fs, die Zeitauflösung betrug etwa 100 fs.

Chinolin	Max Abs. / $\text{cm}^{-1}$	Max Em. / $\text{cm}^{-1}$	Stat. SS / $\text{cm}^{-1}$	$\tau_{solv}$ / ps
MQ	24284	16266	8018	0.62
EtQ	24276	16244	8032	0.64
iPrQ	24353	16113	8240	0.59
2Me-MQ	24581	16282	8299	0.51
2Et-MQ	24519	16169	8590	0.57
2iPr-MQ	24610	16020	8590	0.79
3Me-MQ	24508	16283	8225	0.59
3Et-MQ	24537	16276	8261	0.65
3iPr-MQ	24546	16285	8261	0.60
3tBu-MQ	24593	16280	8313	0.80
3Ada-MQ	24643	16305	8338	-

direkten Vergleich der Kurvenverläufe wurden die zeitabhängigen Stokes-Verschiebungen auch in die Form  $S(t)$ , mit  $S(0.3 \text{ ps}) = 1$  und  $S(20 \text{ ps}) = 0$  überführt. Diese sind in den Abbildungen 3.36, 3.37, 3.38 jeweils rechts dargestellt.

Durch das starke Streulicht der Gate-Harmonischen und die niedrige Signalstärke war die Bestimmung des Peakmaximums relativ ungenau, das  $RMSD$  zu exponentiellen Fits betrug zwischen 20 und  $30 \text{ cm}^{-1}$ . Die erhaltenen Unterschiede zwischen den einzelnen Chinolinen sind sehr gering und wegen der limitierten Auflösung sind nur einige allgemeine Trends zu beobachten. Die Methyl-substituierten Chinoline MQ, 2Me-MQ und 3Me-MQ zeigten die schnellste Solvatationsdynamik mit Solvatationszeiten von etwa 0.6 ps, wohingegen 2iPr-MQ und 3tBu-MQ die längsten Zeiten mit etwa 0.8 ps zeigten. Die Fehlerbereiche sind hier in der Größenordnung von 100-200 fs (nicht gezeigt). Der signifikante Unterschied zwischen MQ und 3tBu-MQ ist auch in Abbildung 3.39 gezeigt.



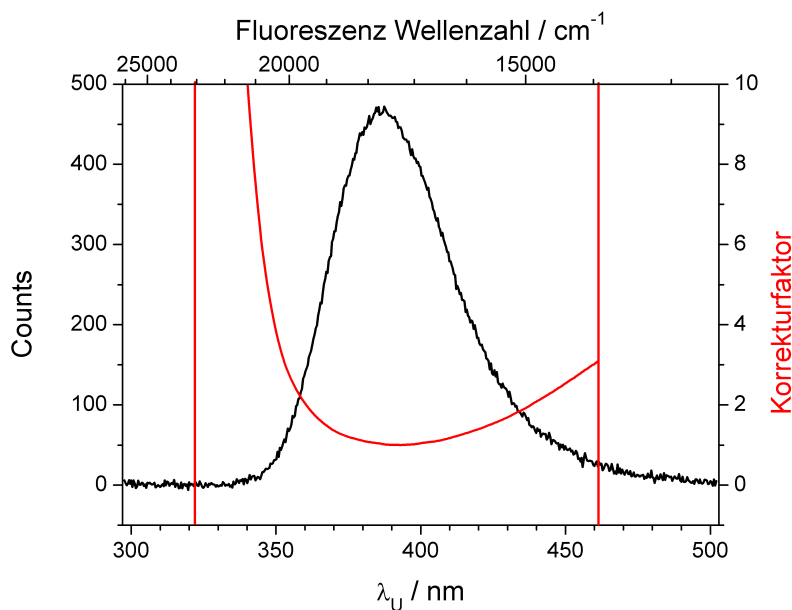
**Abbildung 3.39:** Links: Transiente Fluoreszenzspektren von 3tBu-MQ in wässriger Lösung (rot) und Lognormalfits (schwarz). Deutlich zu sehen ist Streulicht der Gate-Harmonischen bei  $\sim 15700 \text{ cm}^{-1}$ . Rechts ist der direkte Vergleich der normierten Verläufe der Peakpositionen für MQ (schwarz) und 3tBu-MQ (rot) gezeigt. Der Unterschied in der Dynamik ist klein, aber signifikant.

### 3.4.3 FLUPS-Präzisionsmessungen

Wie gezeigt, stellt dieses Problem die fs-Fluoreszenzmessung vor eine grundsätzliche Herausforderung. In Abbildung 3.39 links ist zu sehen, dass die Präzision für die Bestimmung des Peakmaximums limitiert ist durch starkes Gate-Streulicht und das Signal-Rausch-Verhältnis. Ersteres kann durch Verwendung eines neuen BBO-Kristalls und sorgfältige Einstellung von L4, sowie der Blende W vor dem Spiegel M4 minimiert werden. Um das Signal-Rausch-Verhältnis signifikant zu verbessern muss entweder bedeutend öfter gemittelt oder die Signalintensität verstärkt werden.

In Abschnitt 2.3 wurde gezeigt, dass durch Verwendung von Case A die Aufkonversionseffizienz um den Faktor 3-5 verbessert werden kann auf Kosten der beobachtbaren Bandbreite. Für Q wird aufgrund der großen Stokes-Verschiebung ein relativ breiter Wellenlängenbereich benötigt. Wie ebenfalls in Abschnitt 2.3 dargelegt, ist dieser jedoch variabel, wenn die Photometrik für die gewählte Einstellung bestimmt wird.

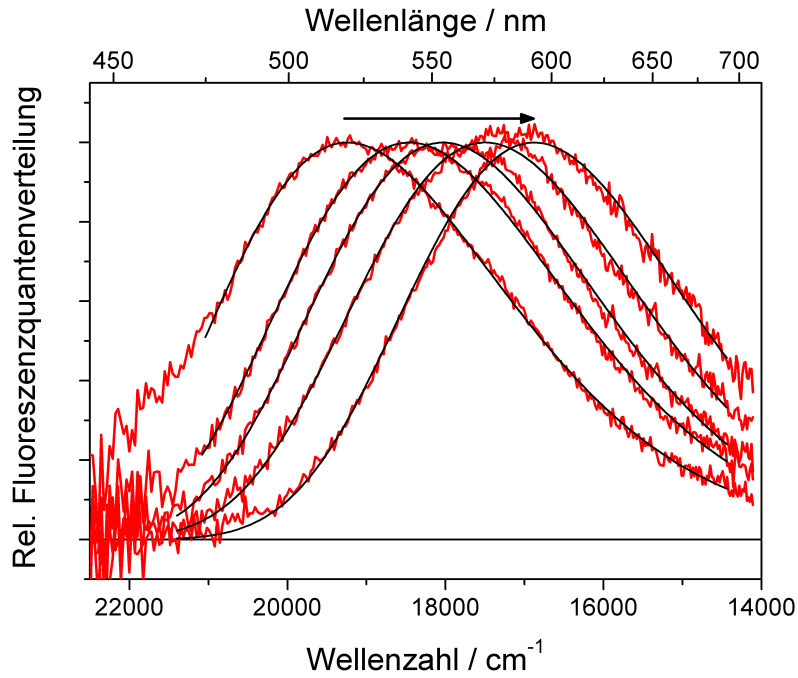
Lösungen von MQ und 3tBu-MQ wurden daher noch einmal mit Case A gemessen. Für



**Abbildung 3.40:** Technisches Fluoreszenzspektrum (schwarz) 300 fs nach Anregung von 3tBu-MQ in wässriger Lösung ( $pH = 9$ ), Mittelung von 32 Spektren. In rot ist die photometrische Korrekturfunktion gezeigt, sowie deren Grenzen.

3tBu-MQ ist in Abbildung 3.40 das gemittelte technische Spektrum 300 fs nach Anregung gezeigt, vor Anwendung der photometrischen Korrektur.

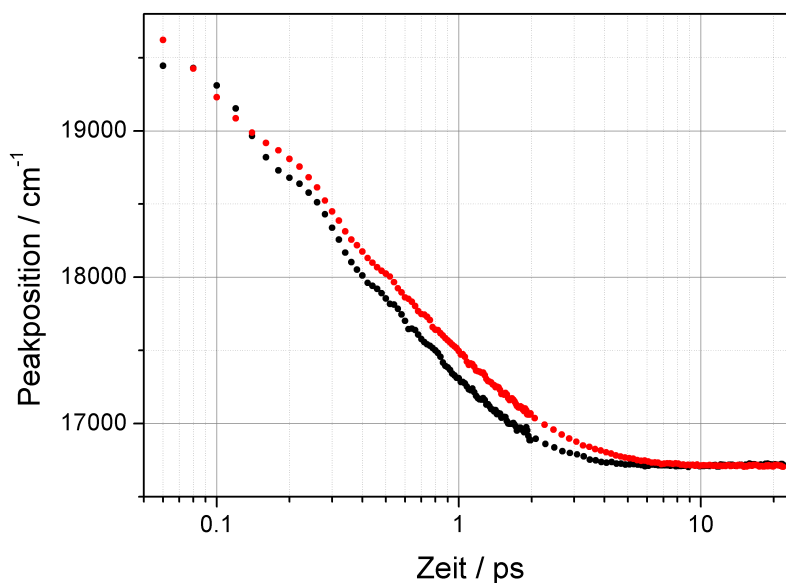
Nach photometrischer Korrektur ergeben sich die transienten Fluoreszenzspektren, für 3tBu-MQ gezeigt in Abbildung 3.41. Lediglich leichte Überlagerung von gestreutem, nicht-aufkonvertierten Pumplicht ist zu sehen bei  $\tilde{\nu}_F \sim 17000 \text{ cm}^{-1}$ . Durch Lognormalfits wird der TDSS erhalten, dargestellt in Abbildung 3.42. Gut zu sehen ist, dass die Peakpositionen von MQ und 3tBu-MQ im stationären Zustand ( $t > 10 \text{ ps}$ ) beinahe aufeinanderliegen, in guter Übereinstimmung mit den stationären Spektren. Werden jeweils die ersten Banden betrachtet, für welche die Peakpositionen bestimmt werden konnten ( $\sim 60 \text{ fs}$  nach Anregung), so emittiert 3tBu-MQ bei etwa  $300 \text{ cm}^{-1}$  höheren Wellenzahlen verglichen zu MQ. Dies entspricht der Blauverschiebung der stationären Absorptionsbande. Für beide Chinoline ist in den ersten 300 fs eine gedämpfte Oszillation zu sehen ( $\sim 210 \text{ cm}^{-1}$ ). Danach ist die bereits erwähnte schwache Verlangsamung der Solvatationsdynamik nun deutlich



**Abbildung 3.41:** Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren von 3tBu-MQ in Wasser ( $pH = 9$ ) 0.3, 0.5, 1 und 3 ps nach Anregung (rot) und Lognormalfits (schwarz).

erkennbar. Ein Einfluss einer eingeführten unpolaren Gruppe (*tert*-Butylgruppe) auf den TDSS in wässriger Lösung ist damit erstmals gezeigt.

Mit mehreren Techniken wurde eine Temperaturabhängigkeit der Verlangsamung von Wassermolekülen um unpolare Gruppen gezeigt.<sup>[9,154,167,174]</sup> Die FLUPS-Experimente für 3tBu-MQ und MQ wurden daher für 8 °C und 37 °C wiederholt. Dafür wurde der Zufluss zur Durchflusszelle durch ein Wasserbad geleitet, welches wiederum durch einen Thermostat temperiert wurde. Die Temperaturmessung erfolgte am Ausfluss der Zelle. Nach analog erfolgter Auswertung ergaben sich zeitabhängige Stokes-Shifts, welche mit exponentiellen Funktionen gefittet wurden. Die Parameter sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die Abweichungen von diesen Fits betragen etwa  $RMSD = 10 \text{ cm}^{-1}$ , die exakten Werte für jede Kurve sind zusammen mit den mittleren Solvatationszeiten  $\tau_{solv}$  in Tabelle 3.6 gezeigt. Zum Vergleich der Solvatationsdynamiken bei den jeweiligen Temperaturen wurde  $\tilde{\nu}(t)$  überführt zu  $S(t)$ . Sie sind dargestellt in Abbildung 3.43.



**Abbildung 3.42:** Zeitabhängiger Stokes-Shift  $\tilde{\nu}(t)$  für MQ (schwarz) und 3tBu-MQ (rot) in wässriger Lösung ( $pH = 9$ ,  $20.5^\circ\text{C}$ ).

Wie bereits für  $20.5^\circ\text{C}$  erwähnt, ist zu frühen Zeiten eine Oszillation sichtbar. Betrachtet man nur die Residuen zu den triexponentiellen Fits, für  $S(t)$  zu sehen in Abbildung 3.44, so ist diese Oszillation gut zu sehen für alle Temperaturen, besonders stark ist sie bei  $37^\circ\text{C}$  ausgeprägt. Ähnliche gedämpfte Oszillationen auf  $S(t)$  wurden bereits vorher beobachtet und Moden der Umgebung zugeordnet.<sup>[21,75]</sup> Dies bedeutet auch, dass die Abweichungen *RSMD* hier nicht die Präzision der Messungen angeben, da die größten Abweichungen systematisch sind. Dass die Oszillationen in diesen Messungen sichtbar sind, zeigt die gute zeitliche und spektrale Auflösung.

Die Temperaturabhängigkeit der Solvatationsdynamik ist direkt sichtbar in Abbildung 3.43, die Solvatationszeiten für beide Chinoline sinken mit steigender Temperatur. Die Verlangsamung der Dynamik von 3tBu-MQ im Vergleich zu MQ wird bei allen drei Temperaturen beobachtet. Es wurde ein Arrhenius-Plot erstellt, zu sehen in Abbildung 3.45. Die Wasserreorientierung scheint für beide Chromophore vom Arrhenius-Verhalten abzuweichen, was in Übereinstimmung mit NMR- und MD-Untersuchungen steht.<sup>[9,167]</sup> Wenn das

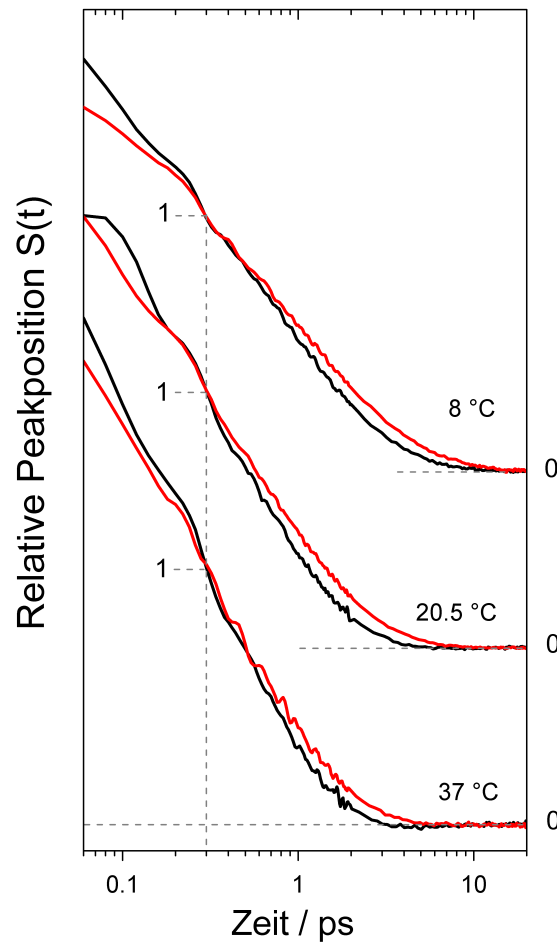
**Tabelle 3.5:** Fitparameter für Fits von  $\tilde{\nu}(t)$  mit 3 beziehungsweise 2 Exponentialfunktionen von MQ und 3tBu-MQ. Die Zeitauflösung betrug etwa 100 fs.

	$A_1/\text{cm}^{-1}$	$t_1/\text{ps}$	$A_2/\text{cm}^{-1}$	$t_2/\text{ps}$	$A_3/\text{cm}^{-1}$	$t_3/\text{ps}$	$A_0/\text{cm}^{-1}$
8 °C							
MQ	1010 $\pm 30$	0.111 $\pm 0.005$	1190 $\pm 50$	0.67 $\pm 0.04$	860 $\pm 70$	2.2 $\pm 0.1$	16792 $\pm 2$
3tBu-MQ	1000 $\pm 30$	0.219 $\pm 0.008$	1340 $\pm 60$	1.15 $\pm 0.07$	660 $\pm 80$	3.7 $\pm 0.3$	16814 $\pm 2$
20.5 °C							
MQ	1570 $\pm 30$	0.192 $\pm 0.007$	1770 $\pm 40$	0.91 $\pm 0.02$	-	-	16716 $\pm 2$
3tBu-MQ	1220 $\pm 90$	0.15 $\pm 0.01$	1300 $\pm 100$	0.63 $\pm 0.9$	900 $\pm 200$	1.7 $\pm 0.2$	16712 $\pm 2$
37 °C							
MQ	1220 $\pm 30$	0.121 $\pm 0.05$	1710 $\pm 30$	0.644 $\pm 0.009$	-	-	16666 $\pm 2$
3tBu-MQ	430 $\pm 80$	0.05 $\pm 0.01$	1330 $\pm 60$	0.22 $\pm 0.02$	1430 $\pm 60$	0.96 $\pm 0.03$	16675 $\pm 2$

Arrhenius-Verhalten näherungsweise angenommen wird, ergeben sich Aktivierungsenergien für die Wasserreorientierung von  $4.9 \pm 0.7 \text{ kcal mol}^{-1}$  für MQ und  $6.9 \pm 0.9 \text{ kcal mol}^{-1}$  für 3tBu-MQ. Dieses Verhalten ist auch bei direkter Betrachtung des Plots zu erkennen. Die Verlangsamung der Dynamik, hervorgerufen durch die *tert*-Butylgruppe, verstärkt sich bei niedrigeren Temperaturen. Da beide Chinoline bei jeweils exakt gleicher Temperatureinstellung gemessen wurden, ist die relative Abweichung für die Temperatur deutlich kleiner als der absolute Fehler von 1 K, welcher in Abbildung 3.45 eingetragen ist.

Diese Befunde sollen nun mit anderen temperaturabhängigen Messungen verglichen werden. NMR- $T_1$ -Zeiten für TMAO in Wasser zeigten, dass die Störung der Dynamik durch die hydrophoben Gruppen mit steigender Temperatur im Intervall von 8-37 °C leicht abnahm.<sup>[167]</sup> Dies wurde durch MD-Simulationen reproduziert<sup>[9]</sup> und steht in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen dieser Arbeit.

Ein deutlich stärkerer Effekt durch Aufheizen wurde für Anisotropieabfälle der O-D-

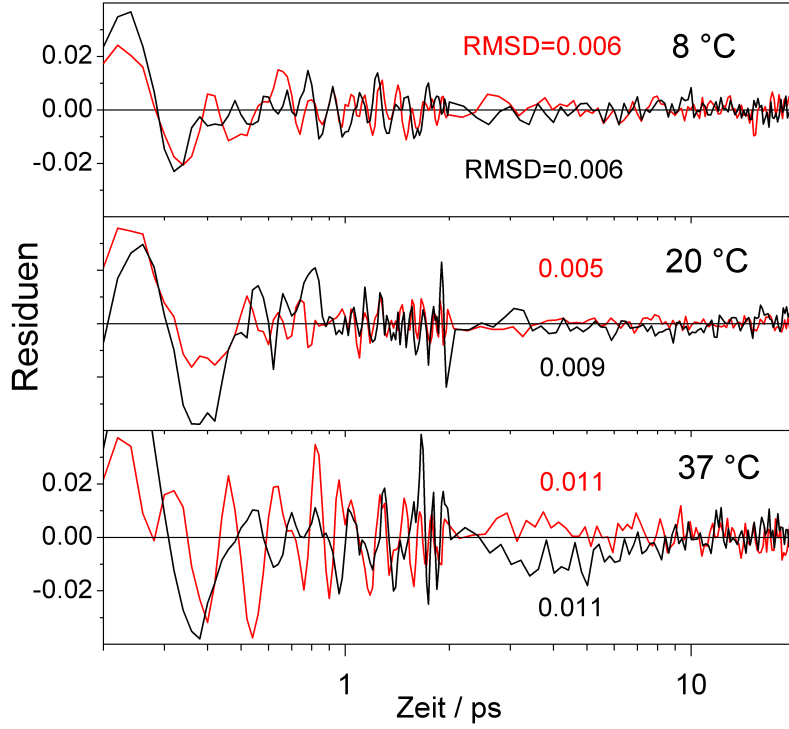


**Abbildung 3.43:** Normierter zeitlicher Verlauf der Peakwellenzahl  $S(t)$  für MQ (schwarz) und 3tBu-MQ (rot) für 3 verschiedene Temperaturen.

Streckschwingung in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Mischungen gefunden, bei Konzentrationvariation von *tert*-Butanol oder TMU.<sup>[154]</sup> Das Ausmaß der Verlangsamung der Dynamik nahm stark mit der Temperatur ab, bei 60 °C gab es keine Unterschiede mehr zu Bulk-Wasserdynamik („Schmelzen der Eisberge“). Ähnliche Beobachtungen wurden für Ramanspektren von Alkohol/Wasser-Mischungen gemacht.<sup>[174]</sup> Solch ausgeprägtes Schmelzverhalten wurde hier nicht beobachtet, eventuell sollten Messungen bei höheren Temperaturen unternommen werden.

Es soll auch für MQ/3tBu-MQ der Einfluss auf das lokale dielektrische Spektrum  $\epsilon(\omega) =$





**Abbildung 3.44:** Residuen nach Fits mit triexponentiellen Funktionen der in Abbildung 3.43 gezeigten  $S(t)$  von MQ (schwarz) und 3tBu-MQ (rot). Deutlich zu sehen ist, dass die Abweichungen systematisch sind und gedämpfte Oszillationen zu frühen Zeiten bilden.

$\epsilon'(\omega) - i\epsilon''(\omega)$  untersucht werden. Wie bereits beschrieben, wird dafür ein Modellfit mit Parametern aus Debyefunktionen an den zeitabhängigen Stokes-Shift angepasst. Da  $\tilde{\nu}(t)$  mit zwei bzw. drei Exponentialfunktionen gefittet wurde, lässt sich das entsprechende  $\epsilon(\omega)$  mit zwei bzw. drei Debyefunktionen beschreiben.<sup>[13]</sup> Die erhaltenen dielektrischen Verlustspektren  $\epsilon''(\omega)$  sind in Abbildung 3.46 dargestellt und die Fitparameter sind in Tabelle 3.7 gezeigt. Wie bereits in einer früheren Arbeit gezeigt,<sup>[13]</sup> reproduziert der TDSS für basische Lösungen von MQ relativ gut das dielektrische Spektrum von reinem Wasser aus kombinierten Mikrowellenmessungen.<sup>[14]</sup> Die Einführung der *tert*-Butylgruppe führt zu einer Verschiebung des dielektrischen Spektrums zu niedrigeren Frequenzen, was der bereits gezeigten Verlangsamung der Solvationsdynamik entspricht. Diese Verschiebung ist auch in den Spektren aus THz-Spektroskopiemessungen von Shiraga *et al.* zu erkennen,<sup>[170]</sup> aber

**Tabelle 3.6:** Quadratisches Mittel der Residuen von  $\tilde{\nu}(t)$  zu exponentiellen Fits (*RMSD*) und mittlere Solvatationszeiten für MQ und 3tBu-MQ.

	<i>RMSD</i> /cm <sup>-1</sup>	$\tau_{solv}$ /ps
8 °C		
MQ	9	0.9±0.1
3tBu-MQ	10	1.4±0.2
20.5 °C		
MQ	13	0.57±0.06
3tBu-MQ	8	0.76±0.03
37 °C		
MQ	13	0.43±0.03
3tBu-MQ	15	0.53±0.05

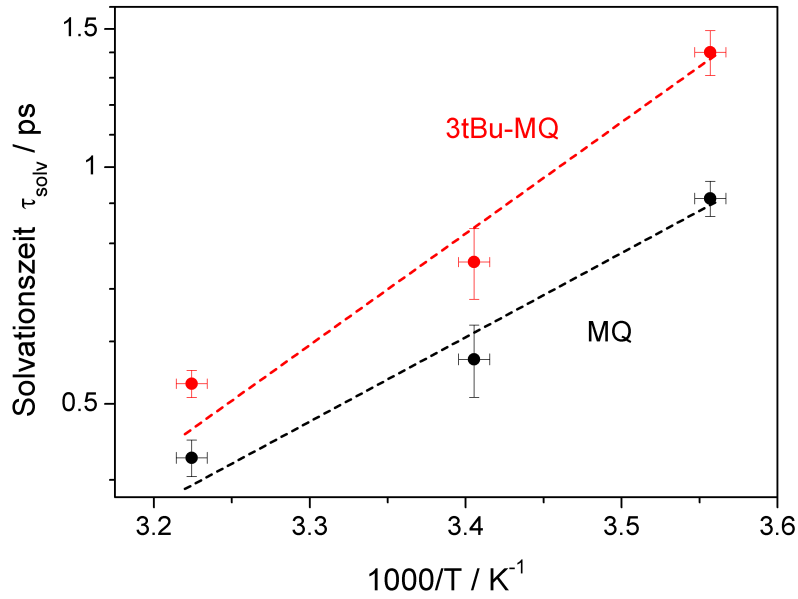
**Tabelle 3.7:** Parameter von dielektrischen Modellfits für  $\tilde{\nu}(t)$  von MQ und 3tBu-MQ bei 20.5 °C. Feste Parameter (*kursiv*) wurden aus Quelle 13 entnommen. Die Permittivität der direkten Umgebung wurde festgesetzt auf  $\epsilon_{cav} = 5.29$ .  $\delta_1$  ist abhängig von den anderen Amplituden.

	$\epsilon_0$	$\delta_1$	$\tau_1$ /ps	$\delta_2$	$\tau_2$ /ps	$\delta_3$	$\tau_3$ /ps	$\epsilon_\infty$
MQ	<i>79.83</i>	(76.34)	10.80	<i>0.00</i>	-	1.67	0.29	<i>1.8</i>
3tBu-MQ	75.36	(63.08)	15.92	8.65	7.56	1.80	0.40	1.8

deutlich weniger stark ausgeprägt.

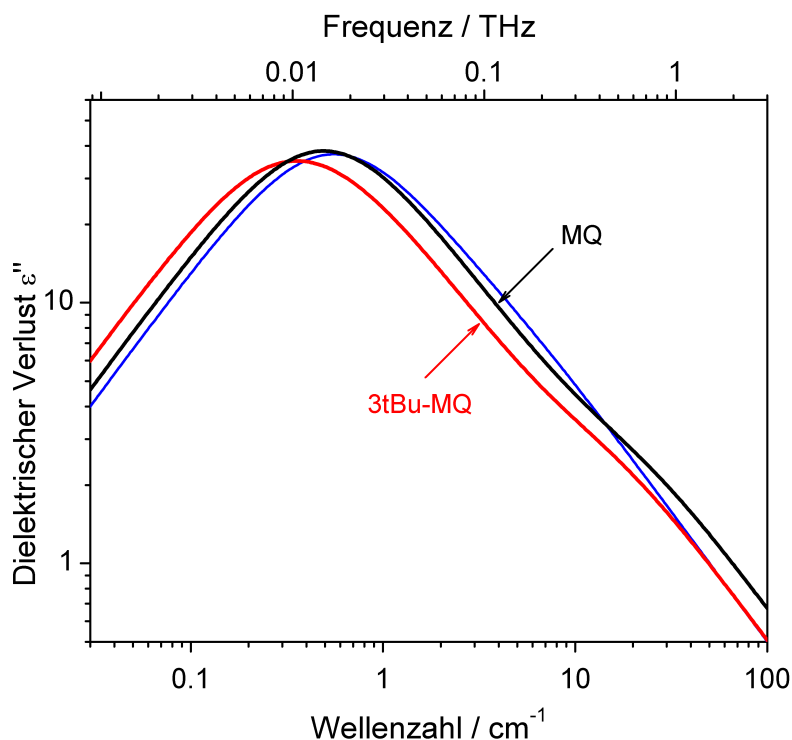
### 3.4.4 Transiente Absorption

Zusätzlich wurden auch hier transiente Absorptionsmessungen durchgeführt, um zu zeigen, dass die schwache Verlangsamung der Solvatationsdynamik für 3tBu-MQ im Vergleich zu MQ auch mit anderen Methoden beobachtet werden kann. Transiente Spektren für 3tBu-MQ bei 20.5 °C in basischer Lösung sind in Abbildung 3.47 gezeigt. Zu sehen sind auch hier Absorption angeregter Zustände ESA, als positiver Anteil sowie Grundzustandausbleichen BL und stimulierte Emission SE als negative Anteile. Die Solvatationsdynamik ist dabei durch eine Rot-Verschiebung der SE-Bande gegeben.<sup>[21,26,95]</sup> Die Bestimmung des Shifts ist stärker fehlerbehaftet, als bei der transienten Fluoreszenz. Zum einen wird die SE-Bande durch ESA teilweise überlagert, wie bei  $\sim 20000 \text{ cm}^{-1}$  zu erkennen ist. Zum anderen



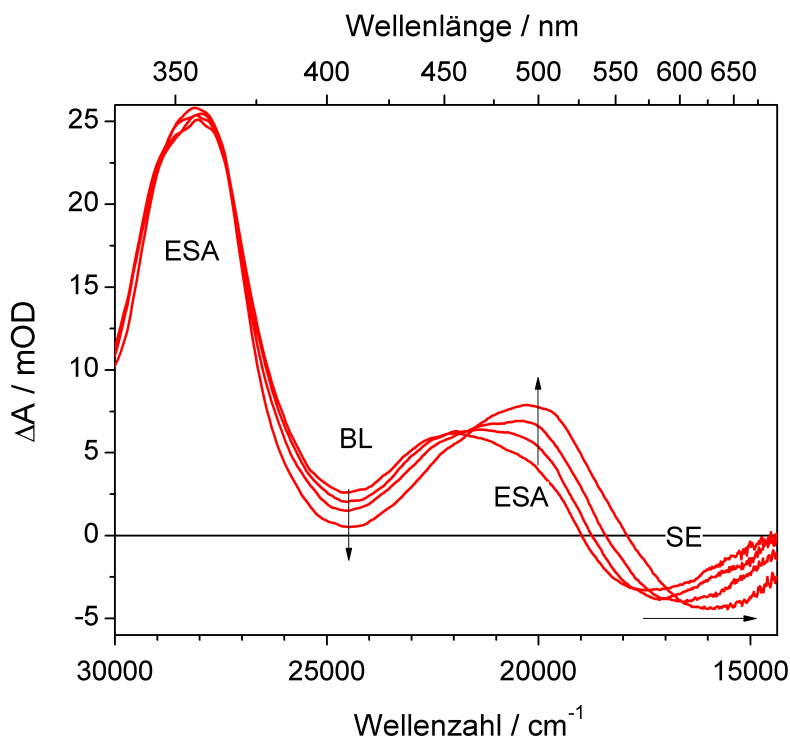
**Abbildung 3.45:** Arrhenius-Plot der Solvationszeit  $\tau_{solv}$ . Die gestrichelten Linien repräsentieren Arrhenius-Verhalten mit Aktivierungsenergien von  $\sim 4.9$  bzw.  $6.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

weist das Rauschen in den transienten Absorptionsmessungen spektrale Korrelation auf, welche zu Verformungen der extrahierten SE-Banden führen. Das Verfahren, um die transienten SE-Spektren zu extrahieren, indem eine stationäre ESA bestimmt und abgezogen wird, wurde bereits in Abschnitt 3.3 dargelegt. Es wurde hier ebenfalls angewandt, allerdings wurden die SE-Spektren anschließend mit  $\tilde{\nu}^2$  multipliziert für eine Überführung zur spontanen Emission bzw. Fluoreszenz. Die Spektren sind Abbildung 3.48 dargestellt. Sie wurden ebenfalls mit Lognormalfunktionen gefittet um den TDSS zu erhalten. Die entsprechende Solvationszeiten  $\tau_{solv}$  sind mit  $0.6 \pm 0.1 \text{ ps}$  für MQ und  $0.8 \pm 0.1 \text{ ps}$  für 3tBu-MQ in sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den FLUPS-Messungen. Auch hier zeigt sich eine deutliche Verlangsamung durch die Einführung der unpolaren Gruppe. Für den direkten Vergleich wurde erneut jeweils  $S(t)$  bestimmt, wie in Abbildung 3.49 gezeigt. Wie bereits erwähnt ist die Präzision der Bestimmung der Peakposition schlechter, was sich in einem *RMSD* von 34 zeigt. Nichtsdestotrotz konnte die Verlangsamung mit dieser Technik bestätigt werden.



**Abbildung 3.46:** Dielektrisches Verlustspektrum  $\epsilon''(\omega)$ , berechnet aus dem zeitabhängigen Stokes-Shift für MQ und 3tBu-MQ. Zusätzlich ist das Spektrum für reines Wasser aus Mikrowellenmessungen als blaue Linie gezeigt.

Weiterhin konnte aus polarisationsabhängigen Messungen der Anisotropieabfall  $r(t)$  nach Gleichung 2.27 bestimmt werden, welcher abhängig von der Rotationsdiffusion des Chromophors ist.<sup>[71]</sup> Für MQ wurde die Anisotropie für BL, ESA und SE jeweils separat bestimmt. Die (skalierten) zeitlichen Verläufe für SE und BL sind in Abbildung 3.50 dargestellt. Der Verlauf für ESA ist nicht gezeigt, da er die gleiche Dynamik wie SE aufweist ( $\tau_r = 22 \pm 1$  ps). Es zeigt sich, dass der Anisotropieabfall für BL sehr langsam im Vergleich zu ESA und SE ist. Da ESA und SE beide den  $S_1$ -Zustand repräsentieren, BL aber den elektronischen Grundzustand lässt sich schlussfolgern, dass die Rotationsgeschwindigkeit von MQ im Grundzustand deutlich langsamer ist als im angeregten Zustand. Dies ist wahrscheinlich auf das deutlich verringerte Dipolmoment im  $S_1$ -Zustand zurückzuführen, sodass die Wechselwirkungen mit den polaren Wassermolekülen geringer werden. Die Dynamik von  $r(t)$  für den BL ist nicht exponentiell, was auf die überlagerte ESA-Bande



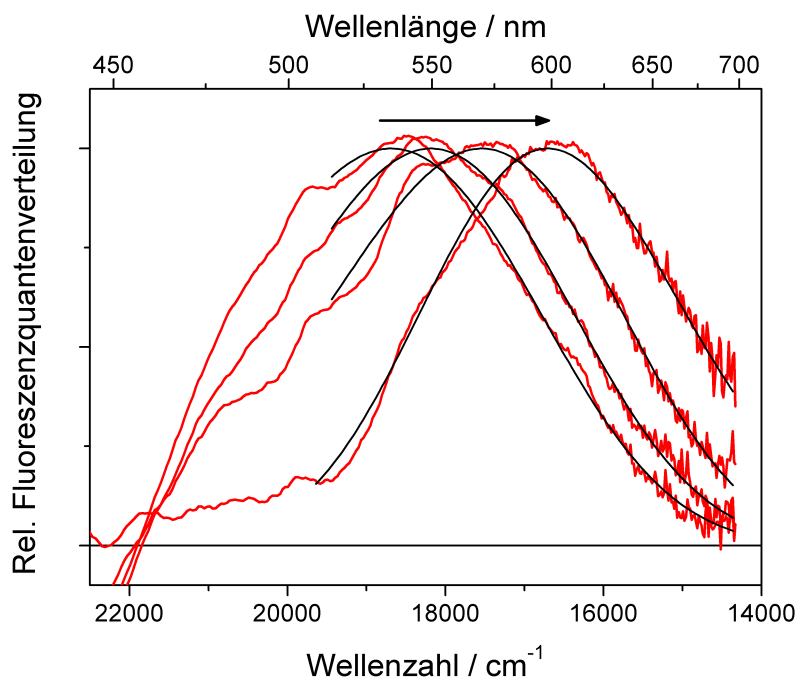
**Abbildung 3.47:** Transiente Absorptionsspektren von 3tBu-MQ in wässriger Lösung ( $pH = 9$ ), 0.3, 0.5, 1 und 10 ps nach Anregung.

zurückzuführen sein könnte.

Für 3tBu-MQ konnte der Anisotropieabfall nur für die SE bestimmt werden, da sich hier ESA und BL teilweise vollständig auslöschen. Wie zu erwarten ist dieser langsamer ( $\tau_r = 51 \pm 3$  ps) als der entsprechende Verlauf für MQ, aufgrund der voluminösen *tert*-Butylgruppe.

### 3.4.5 Diskussion

Der beobachtete Einfluss der *tert*-Butylgruppe auf die Solvatationsdynamik um den Chromophor Q ist sehr gering. Zum einen muss bedacht werden, dass weiterhin die Umgebungsdynamik um die gesamte Polaritätssonde betrachtet wird und Wassermoleküle nahe der aliphatischen Gruppe sich bereits in gewisser Entfernung zum eigentlichen Chromophor befinden. Nichtsdestotrotz sollten stark verlangsamte Wassermoleküle („Eisberge“) eine

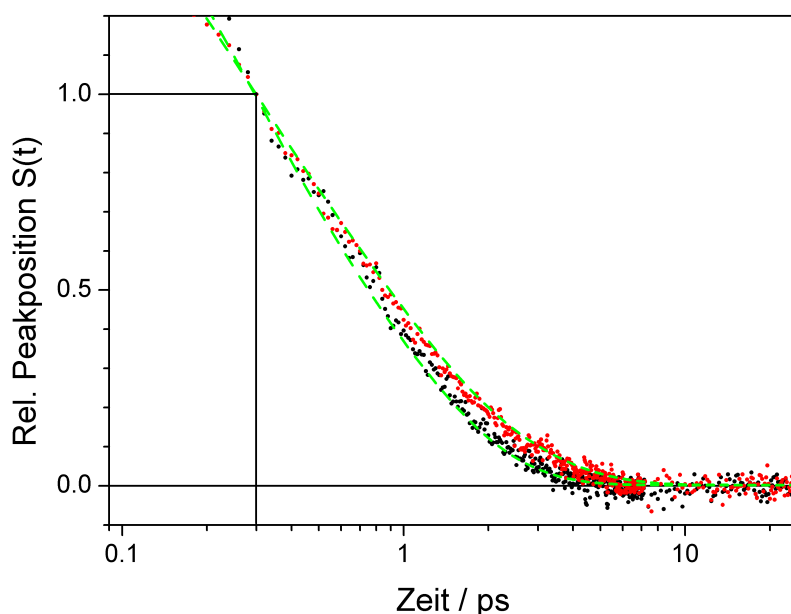


**Abbildung 3.48:** Zeitabhängige Fluoreszenzspektren (rot) 0,3, 0,5, 1 und 10 ps nach Anregung, berechnet aus den extrahierten SE-Banden der transienten Absorptionsspektren. In schwarz sind die entsprechenden Lognormalfits gezeigt. Deutlich sichtbar sind die erwähnten Verformungen, welche die Fits erschwerten.

sehr langsame Komponente im TDSS hervorrufen.

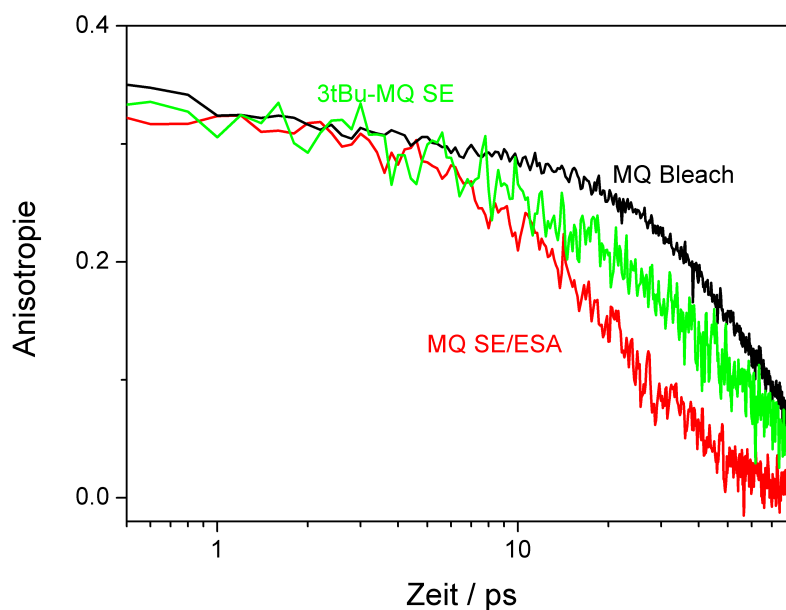
Wie bereits erwähnt, wurde in wässrigen Lösungen bislang keine Abhängigkeit der Solvatationsdynamik von der Struktur der Polaritätssonde veröffentlicht,<sup>[23]</sup> obwohl es Hinweise aus Simulationen zu diesem Thema gibt.<sup>[181–184]</sup> Eine Erklärung dafür sind die erwähnten Schwierigkeiten, betreffend zeitlicher und spektraler Auflösung, sowie die Wahl eines geeigneten Chromophors für solche Untersuchungen. Kumar und Maroncelli sagten aufgrund von MD-Simulationen voraus, dass Farbstoffabhängigkeiten der Solvatationsdynamik mit der Eigenrotation des Chromophors korreliert seien,<sup>[179]</sup> was später für Methanol belegt wurde.<sup>[23,180]</sup>

In Kooperation zu dieser Arbeit wurden von Esther Heid (Arbeitsgruppe Christian Schrö-



**Abbildung 3.49:** Relative Peakwellenzahl  $S(t)$  der transienten Fluoreszenzspektren von MQ (schwarz) und 3tBu-MQ (rot), berechnet aus transienten Absorptionsspektren (siehe Abbildung 3.48). Entsprechende Kurven aus den FLUPS-Präzisionsmessungen sind als grüne gestrichelte Linien gezeigt.

der, Universität Wien) Nichtgleichgewichts-MD-Simulationen von MQ,<sup>[29,30]</sup> sowie von 3tBu-MQ und weiteren Chinolinen<sup>[185]</sup> in wässrigen Lösungen durchgeführt. Dabei wurde die Antwort des Systems auf die Ladungsänderung im Chromophor untersucht. Die in den Experimenten beobachtete Verzögerung durch die aliphatischen Gruppen konnte dabei reproduziert werden. Interessanterweise verschwand der Großteil des Unterschied in der Dynamik, wenn die Koordinaten des Chromophors während der Simulation festgehalten wurden, wenn also weder Schwingungen, Rotation, noch Translation des Farbstoffs zugelassen waren. Es wurde geschlossen, dass der Unterschied der spektralen Relaxation hauptsächlich auf Kopplung von vibronischer Relaxation auf umgebende Wassermoleküle zurückzuführen ist. Eine zu Abbildung 3.45 äquivalente Auftragung wurde ebenfalls erstellt. Es ergab sich auch hier eine zusätzliche Aktivierungsbarriere für die Solvatationsdynamik in Wasser, hervorgerufen durch das Einbringen der tertiären Butyl-Gruppe. Die Erhöhung von  $5.4 \text{ kJ mol}^{-1}$  ist in guter Übereinstimmung zu dem Ergebnis dieser Arbeit ( $5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ).



**Abbildung 3.50:** Anisotropieabfall  $r(t)$  aus transienten Absorptionsmessungen. Die rote und die grüne Linie wurde skaliert auf den Wert der schwarzen.

### 3.4.6 Zusammenfassung

In der Literatur wird das Ausmaß der Verlangsamung der Wasser-Reorientierungsdynamik durch hydrophobe Gruppe diskutiert. In dieser Arbeit wurde durch präzise FLUPS-Messungen von MQ und einem Derivat, welches eine *tert*-Butylgruppe trägt, eine sehr schwache Retardation beobachtet, bestätigt durch transiente Absorptionsmessungen. Im Gegensatz zu den meisten Experimenten auf diesem Feld konnte die beobachtete Verzögerung in dieser Arbeit eindeutig lokalen Effekten zugeordnet werden. Weiterhin können hydrophile Effekte ausgeschlossen werden, weil bei den substituierten Chinolinen nur die hydrophobe Seite variiert wurde. Da verdünnte Lösungen verwendet wurden (Verhältnis  $\sim 1:5000$ ), können Überlagerungen der Solvathüllen und Clustereffekte ausgeschlossen werden. Stark verlangsamte Wassermoleküle („Eisberge“) wurden nicht beobachtet, genaue molekulare Aussagen können aufgrund dieser Ergebnisse aber nicht getroffen werden.

Dies ist die erste Arbeit, bei welcher eine Abhängigkeit der Solvatationsdynamik in Wasser von der Polaritätssonde beobachtet werden konnte. Dies wurde durch aktuelle Nichtgleichgewichts-MD-Simulationen reproduziert.



## 4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Methode der breitbandigen fs-zeitaufgelösten Fluoreszenzaufkonversionsspektroskopie (FLUPS) weiterentwickelt und verwendet, um die Solvatations- und Umgebungsdynamik von solvatochromen Farbstoffen in der Nähe von DNA, Lipiden, Peptiden und aliphatischen Gruppen zu bestimmen. Eine Zuordnung der experimentell erhaltenen Dynamik auf molekulare Prozesse wurde jeweils aufgrund von Vergleichen zu MD-Simulationen durchgeführt.

Die Methode FLUPS wurde erweitert um einen neuen Mess-Modus (Case A), bei welchem eine 3- bis 5-fache Signalstärke auf Kosten von einem Teil der beobachtbaren Bandbreite ermöglicht wird. Die Auswertung von den transienten Spektren wurde verbessert, indem schnelle und reproduzierbare Prozeduren zur Bestimmung der Gatewellenlänge und der photometrischen Korrekturfunktion erstellt wurden. Zusätzlich konnte anhand des Vergleichs von vorhergesagten und experimentell bestimmten photometrischen Korrekturfunktionen gezeigt werden, dass die Methode nun quantitativ theoretisch beschrieben ist.

Für die Solvatationsdynamik von Nukleinsäuren wurde ein umfassender Literaturüberblick erstellt, wobei jeweils aus den angegebenen Fits der exponentiellen Abfälle von  $S(t)$  die mittlere Solvatationszeit  $\tau_{solv}$  bestimmt wurde. Gemessen wurde das neue System 13mer6HQ, welches den Chromophor Q als Basenanalagon trägt. Es ergibt sich insgesamt eine etwas schnellere Solvatationsdynamik als für andere Systeme berichtet ( $\tau_{solv} = 2.8 \pm 0.2$  ps), die einzelnen Zeitkonstanten sind jedoch in guter Übereinstimmung mit Literaturangaben. Dadurch konnten Ergebnisse von MD-Simulationen anderer Systeme zur Zuordnung der

Dynamiken herangezogen werden. Umgebende Wassermoleküle relaxieren mit 0.3 ps bzw. 2.3 ps, während die längere Zeitkonstante von 21 ps DNA-Relaxierung zugeordnet wurde.

Die Umgebungsdynamik der Kopfgruppenregion einer Phospholipiddoppelschicht wurde das erste Mal experimentell auf einer Zeitskala von 1 ps-15 ns untersucht. Dafür wurde der Membranfarbstoff Laurdan in POPC-Doppelschichten eingebaut und dessen Fluoreszenz mittels FLUPS und TCSPC gemessen. Da dieses System bereits durch MD-Simulationen beschrieben wurde, konnte der Zeitskala von 8-20 ps eine lokale Wasserreorientierung zugeordnet werden. Aufgrund der zeitlichen Entwicklung der Bandenbreite wird die Diffusion des Farbstoffs beobachtet, stark gebundene Wassermoleküle an den geladenen Kopfgruppen, sowie jene Kopfgruppen selbst relaxieren auf einer Zeitskala von 0.6-3 ns. Insgesamt beträgt die mittlere Solvatationszeit  $\tau_{solv} = 480 \pm 30$  ps.

Ein Modellpeptid für Alpha-Helices, markiert mit dem Chromophor Q zeigte überraschenderweise eine sehr schnelle, fast bulkähnliche Solvatationsdynamik ( $\tau_{solv} = 0.71 \pm 0.03$  ps). Die Ergebnisse wurden mithilfe von transienten Absorptionsmessungen des Protonentransfers zum Lösungsmittel reproduziert. Eine Erklärung konnte durch die Arbeitsgruppe Prof. Netz gefunden werden, die MD-Simulationen an dieser Helix durchführte. Durch die Salzbrücken ergibt sich ein sehr geringes effektives Dipolmoment des Peptids, sodass Wassermoleküle nicht gebunden werden. Diese Ergebnisse stellen aktuelle Modelle der Solvatationsdynamik von Proteinen in Frage.

Durch präzise Messungen der Farbstoffe MQ und 3tBu-MQ in Wasser konnte erstmals Solvatationsdynamik von Wasser nahe hydrophober Gruppen mittels Fluoreszenzspektroskopie beobachtet werden. Hinweise auf Eis-artige Dynamiken wurden nicht erhalten, die schwache Verzögerung von  $\tau_{solv} = 0.57 \pm 0.06$  ps für MQ zu  $0.76 \pm 0.03$  ps für 3tBu-MQ deutet eher auf Volumenausschlusseffekte hin. Aus temperaturabhängigen Messungen ergaben sich als Barrieren für die Wasserreorientierung  $4.9 \pm 0.7$  bzw.  $6.1 \pm 0.9$  kcal mol<sup>-1</sup>. Die Ergebnisse repräsentieren dabei auch erstmals eine Abhängigkeit der Solvatationsdynamik von

---

der geometrischen Struktur des Farbstoffs in Wasser. Aktuelle MD-Simulationen deuten an, dass der Unterschied zwischen MQ und 3tBu-MQ hauptsächlich auf der unterschiedlichen Kopplung von vibronischer Relaxation zu nahen Wassermolekülen zurückzuführen ist. Durch transiente Absorptionsmessungen wurden die Ergebnisse der Solvatationsdynamik bestätigt.



# Experimentaltteil

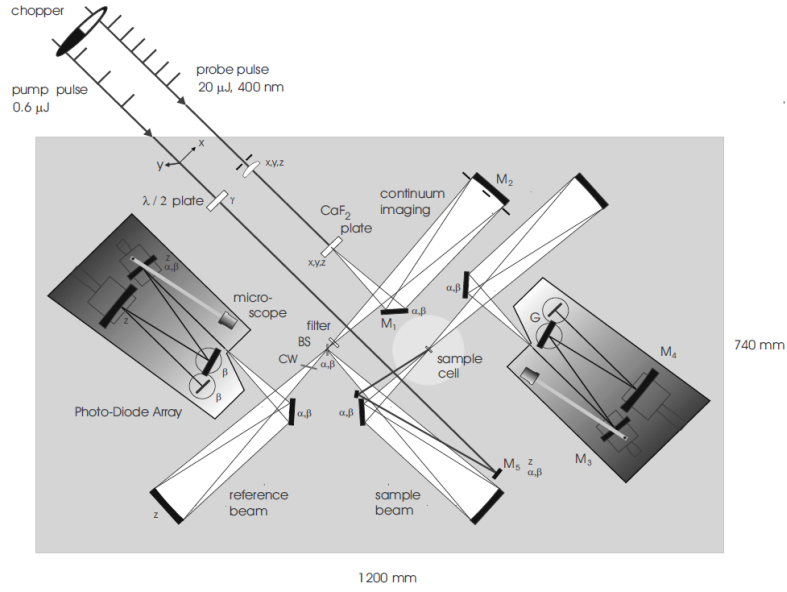
## 1 Verfahren und Geräte

### 1.1 Stationäre Spektroskopie

Stationäre Absorptionsspektren wurden mithilfe eines Varian Cary (Bio3000) aufgenommen. Fluoreszenzspektren wurden gemessen mit einem Spex (Fluorolog 212) Fluorimeter und photometrisch korrigiert. Die Kalibrierung erfolgte mithilfe einer sekundären Standardlampe (Gigahertz-Optik BN-9701). Die Breiten des Eingangs-/Ausgangsspalts für den Anregungs- bzw. Emissionsmonochromator werden folgend in der Form  $\lambda/\lambda = 500/500$  bzw.  $E/E = 1000/1000$  angegeben, wobei sich die Werte in  $\mu\text{m}$  verstehen (Werte hier beispielhaft).

### 1.2 Transiente Absorption

Transiente Absorptionsspektren wurden mithilfe des Pump-Superkontinuum-Probe-Spektrometers aus dem Arbeitskreis Prof. Ernsting erhalten. Der Aufbau (Abbildung 1) ist detailliert in Quelle 143 beschrieben. Die Superkontinuum-Probepulse werden in einer Calciumfluorid-Platte durch frequenzverdoppelte Fundamentalpulse (400 nm,  $\sim 20 \mu\text{J}$ , 30 fs, 500 Hz) eines verstärkten Titan:Saphir-Lasers (Femtolasers sPro) erhalten. Mithilfe eines Farbstofffilters (filter), bestehend aus 2-(*p*-Dimethylamino-styryl)-pyridylmethyliodid (DASPI) und Cumarin 153 wird Licht bei etwa 400 nm abgeschwächt und damit das spektrale Profil des Kontinuums verbessert. Die Probe wird aufgeteilt durch einen Strahlteiler (BS), sodass ein Teil (reference beam) direkt in den Referenzspektrograph geleitet wird. Der andere Teil (sample beam) wird auf die Probenzelle fokussiert und gelangt in

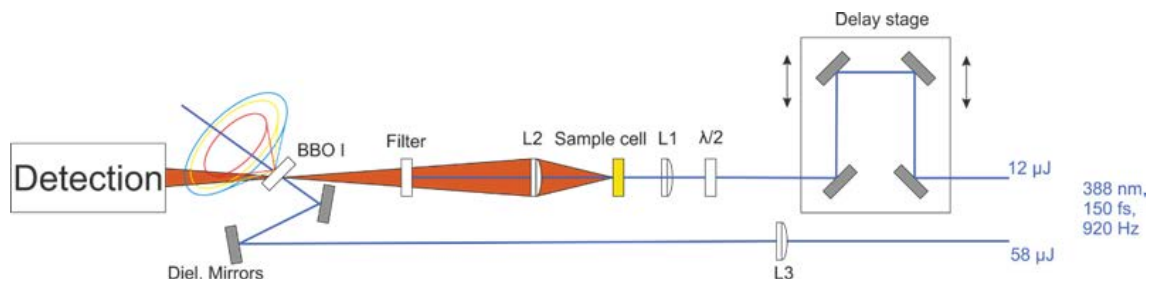


**Abbildung 1:** Setup des fs transienten Absorptionsspektrometers.<sup>[143]</sup>

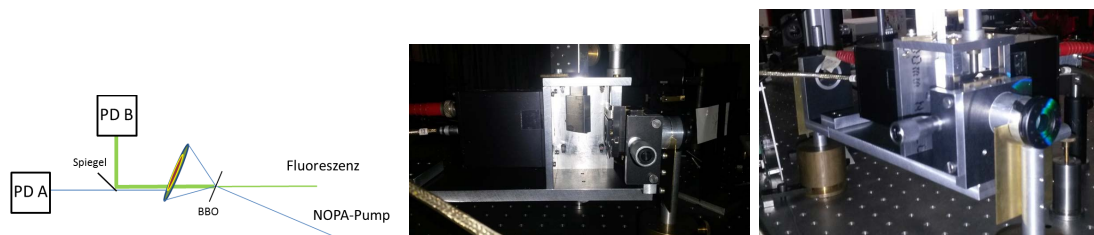
den Signalspektrographen. Die zu messende Probe wird angeregt durch Pumppulse. Die Wellenlänge des Anregungslichts wird hierbei in einem optisch parametrischen Verstärker (LightConversion TOPAS) generiert und ist durchstimmbar. Für das Abfragen der zeitlichen Entwicklung wird der Probe-Strahl mittels eines Verschiebetischs relativ zum Pump-Puls verzögert. Bei einer festen Verzögerungszeit  $t_i$  wird mit einem Chopper jeder zweite Pump-puls blockiert, um jeweils das stationäre Spektrum mit dem transienten Spektrum bei  $t_i$  zu verrechnen.

### 1.3 FNOPAS

Versuche, fs Fluoreszenz mittels nicht-kollinear optisch parametrischer Verstärkung zu detektieren wurden in folgendem einfachen Setup durchgeführt, siehe Abbildung 2. Frequenzverdoppelte Pulse (388 nm, 60 μJ, 150 fs, 920 Hz) des Fundamentalstrahls eines verstärkten Titan:Saphir-Lasers (Clark CPA2001) wurden im Verhältnis 5:1 in einem Strahlteiler aufgeteilt. Der kleinere Anteil wurde verwendet um die Probe (in einer 1 mm-Küvette) anzuregen. Der Anregungsstrahl wurde mit einem Grünglasfilter (Schott, GG420) herausgefiltert und die Fluoreszenz auf den Kristall (BBO, 2 mm,  $\theta_N = 29.2^\circ$ ,  $\varphi_N = 90^\circ$ )



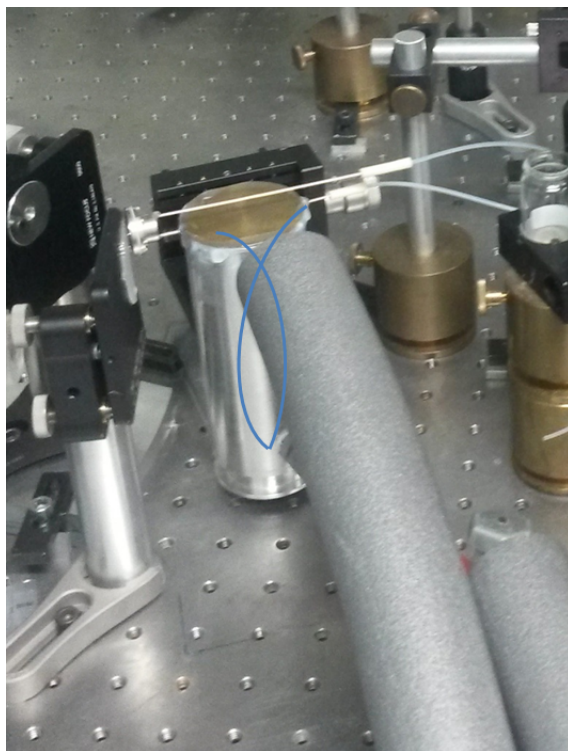
**Abbildung 2:** Setup für verstärkte, fs-zeitaufgelöste Fluoreszenz in einem NOPA.



**Abbildung 3:** Einzelwellenlängen-Detektion des FNOPAS-Setups. Links Schema, in der Mitte und rechts Seit- und Schrägansicht.

fokussiert. Der größere Anteil des Fundamentalstrahls (NOPA-Pump) wurde auf den gleichen Punkt auf dem Kristall fokussiert, wobei der Kristall so um seine Tischnormale Achse gedreht wurde, dass der NOPA-Pump senkrecht einfällt. Die Bandbreite der Verstärkung wurde durch Kippung des Kristalls um seine horizontale Achse eingestellt, die passende Wellenlänge wurde über den Winkel zwischen Fluoreszenz und NOPA-Pump bestimmt.

Für breitbandige Messungen wurde die verstärkte Fluoreszenz analog zum FLUPS-Setup über eine Faser in einen Spektrographen fokussiert. Die Detektion auf einzelnen Wellenlängen mit Referenz erfolgte wie in Abbildung 3 dargestellt. Über eine Iris wurde ein schmaler Spot aus dem Superfluoreszenzring ausgewählt und ein Teil dessen mit einem Spiegel auf die Photodiode B (PD B) abgelenkt, während der übrige Teil auf die Photodiode A (PD A) fiel. Es handelte sich um Photodioden (Hamamatsu S8745-01), welche auf spezielle Platinen mit einem Stromeingangs- und Spannungsausgangs-Verstärker von der Elektronikwerkstatt des Instituts für Physik der Humboldt-Universität zu Berlin montiert wurden.



**Abbildung 4:** Durchflussthermostat für temperaturabhängige FLUPS-Messungen. In blau eingezeichnet ist der Verlauf des Zuflusses zur Durchflusszelle.

## 1.4 TCSPC

TCSPC-Spuren wurden mithilfe eines Edinburgh Instruments FLS920 an der Bundesanstalt für Materialprüfung erhalten, genauere Beschreibung unter 2.7 Laurdan in POPC-Vesikel.

## 1.5 FLUPS

Das FLUPS-Setup wurde bereits ausführlich in Abschnitt 2 beschrieben. In Abbildung 4 ist zusätzlich der Durchflussthermostat für die temperaturabhängigen Messungen von MQ und 3tBu-MQ (siehe Abschnitt 3.4) gezeigt. Die einzelnen Mess-Parameter für gemessenen Proben sind folgend aufgeführt.



## 2 Gemessene Systeme

### 2.1 C153 in DMSO

Die Konzentration wurde so eingestellt, dass die Absorption in einer 1 mm-Küvette 0.6 im Maximum der  $S_1 - S_0$ -Bande betrug. Kurzzeitmessungen (20 fs-Schritte bis 2 ps, 1.5 s Integrationszeit, 16 Messungen) wurden mit einem 100  $\mu\text{m}$  starken BBO-Kristall durchgeführt. Langzeitmessungen (200 fs-Schritte bis 40 ps, bzw. 4 ps-Schritte bis 500 ps, je 1 s Integrationszeit und 8 Messungen) wurden mit dem 500  $\mu\text{m}$  starken BBO-Kristall durchgeführt. Die Polarisation des Anregungslichts wurde senkrecht (perpendikular) zu der detektierten Fluoreszenz gewählt. Es erfolgte kein horizontales Binning und der Kristall wurde auf Case B gedreht.

### 2.2 Azobenzene

Die beiden Azobenzen-Derivate A1 und A2 (Synthetisiert von Javier Moreno) wurden in jeweils in *n*-Hexan und Acetonitril gelöst und gefiltert, wobei die Absorption in einer 1 mm-Küvette 1.5 bei 400 nm betrug. Mit einem 100  $\mu\text{m}$  starken BBO-Kristall, konfiguriert auf Case B wurden Spektren erhalten nach horizontalem Binning von 2 Pixel und einer Integrationszeit von 1.5 s. Die Anregung erfolgte bei 400 nm mit einer Pumpenergie von 1  $\mu\text{J}$  perpendikular zur Detektionspolarisation. Spektren wurden in Schritten von 20 fs bis zu einer maximalen Verzögerungszeit von 4 ps und in 2 ps-Schritten bis 500 ps aufgenommen.

### 2.3 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$

Die Konzentration von  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  (Sigma Aldrich) in Wasser wurde so eingestellt, dass die Absorption in einer 1 mm-Küvette 2.0 im Maximum der  $S_1 - S_0$ -Bande betrug, die Absorption bei 400 nm betrug 0.84. Transiente Fluoreszenzspektren wurden mittels Case A und des 100  $\mu\text{m}$  BBO-Kristalls aufgenommen. Die Detektion erfolgte perpendikular, mit horizontalem Binning (2 Pixel) in 20 fs-Schritten bis 1 ps bei einer Integrationszeit von 4 s. Es wurden 4 Zeitspuren gemittelt.

## 2.4 Corrole

Transiente Fluoreszenzspektren von  $[\text{Al}(\text{tpfc})\text{py}_2]$  in Toluol wurden erhalten unter Verwendung von Case A und Einsatz des 100  $\mu\text{m}$  dicken BBO-Kristalls bei perpendikularer Anregung und horizontalem Binning von je 2 Pixeln. Je 4 Messreihen in 20 fs-Schritten (bis 4 ps), 400 fs-Schritten (bis 4 ps) und 10 ps-Schritten (bis 500 ps) wurden mit Integrationszeiten von 0.5 s aufgenommen.

## 2.5 DANS

*E*-4-Dimethylamino-4'-nitrostilben (Chromophor, Inc.) wurde in Acetonitril gelöst und gefiltert, wobei die Absorption in einer 1 mm-Küvette bei 300 nm 0.8 betrug. Die Anregung erfolgte bei 400 nm, perpendikular und mit einer Pumpenergie von 1  $\mu\text{J}$ . Es wurden Spektren in Schritten von 20 fs bis 3 ps aufgenommen mit einer Integrationszeit von 1.5 s bei horizontalem Binning von 2 Pixeln. Da sich das gestreute Pumplicht während jeder Messung verstärkte (Durch Ablagerungen am Zellfenster), wurde die Zelle nach jeder Serie verschoben.

Für die Messungen im roten Bereich wurde das Gitter im Spektrographen gedreht. Es wurde eine neue Pixel-Wellenlängen-Kalibrierung anhand von Quecksilberlinien vorgenommen. Der Kristall wurde auf Case A konfiguriert und es wurden je 8 Messreihen in Schritten von 20 fs bis 3 ps und 200 fs bis 30 ps aufgenommen, bei einer Integrationszeit von 1.5 s und horizontalem Binning von 2 Pixeln. Die photometrische Korrektur wurde anhand der Spektren für C153 und DCM extrapoliert.

## 2.6 13mer6HQ

1.6  $\mu\text{mol}$  13mer6HQ Doppelstrang (synthetisiert von Felix Hövelmann) wurden in 700  $\mu\text{L}$  wässrige Pufferlösung (150 mM NaCl, mit  $\text{NH}_3$  auf  $pH = 9$  eingestellt) gelöst. Anschließend wurde die Probe über 30 min bis 55  $^{\circ}\text{C}$  hybridisiert. Die stationären Spektren wurden in einer 1 mm Küvette aufgenommen, die Anregung für die Fluoreszenzmessungen erfolgte

bei 400 nm.

Dieselbe Probe wurde für die FLUPS-Messungen verwendet. Die Anregung erfolgte bei 400 nm unter perpendicularen Bedingungen bei einer Pulsenergie von 1.6  $\mu\text{J}$ . Es wurde ein 500  $\mu\text{m}$  starker Kristall im Modus Case B verwendet. Spektren wurden aufgenommen mit 3 s Integrationszeit in Schrittweiten von 20 fs (bis 2 ps), 200 fs (bis 30 ps), 3 ps (bis 300 ps) und 15 ps (bis 1035 ps), wobei je 16 Zeitspuren gemittelt wurden. Die Zeitauflösung wurde anhand der FWHM der Kreuzkorrelation für reines Methanol zu 200 fs bestimmt.

## 2.7 Laurdan in POPC-Vesikeln

Für die FLUPS- und TCSPC-Messungen wurden POPC und Laurdan (beides von Sigma Aldrich) im Verhältnis 100:1 in Chloroform in einem Rundkolben gelöst. Das Chloroform wurde unter vermindertem Druck entfernt, sodass ein dünner Lipidfilm auf der Gefäßwand zurückblieb. Es wurde eine wässrige Pufferlösung (10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid, 100 mM Natriumchlorid,  $pH = 7.1$ ) zugegeben, sodass die Lipidkonzentration 40 mM betrug. Die Probe wurde für 30 min bei 40 °C geschüttelt und 15 min unter Stickstoffatmosphäre im Ultraschallbad beschallt. Die erhaltene Suspension multilamellarer großer Vesikel wurde 21 Mal durch eine Polycarbonatmembran extrudiert. Für die anregungswellenlängenabhängige Fluoreszenzmessungen wurde eine Lipidkonzentration von 10 mM gewählt bei einem POPC:Laurdan-Verhältnis von 50:1.

Stationäre Fluoreszenzmessungen erfolgten in 1 mm-Küvetten unter *front face* Detektion. Die Anregung erfolgte bei 400 nm, bei Spaltbreiten im Anregungsmonochromator von 400 bzw. 300  $\mu\text{m}$  ( $X/X = 300/400$ ). Im Emissionsmonochromator betrugen diese jeweils 1000  $\mu\text{m}$  ( $M/M = 1000/1000$ ). Es wurden 9 Spektren gemittelt. Für die anregungswellenlängenabhängigen Messungen wurde die Spaltbreiten  $X/X = 500/500$  und  $M/M = 1000/1000$  verwendet, wobei von 350 bis 420 nm in 5 nm-Schritten ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen wurde.

FLUPS-Messungen wurden in Case B unter perpendicularer Anregungspolarisation und

ohne horizontales Binning gemessen. Für die Kurzzeitmessungen (Schrittweite 20 fs, bis 2 ps, 3 s Integrationszeit) wurde ein 100  $\mu\text{m}$  starker BBO-Kristall verwendet, die Gatewellenlänge betrug  $\lambda_G = 1350 \text{ nm}$ . Die Langzeitmessungen (200 fs-Schritte bis 40 ps, bzw. 4 ps-Schritte bis 500 ps, je 1 s Integrationszeit) wurden mit einem 500  $\mu\text{m}$  starken Kristall durchgeführt, die Gatewellenlänge wurde bestimmt zu  $\lambda_G = 1360 \text{ nm}$ . Die Pumpenergie betrug 2-3  $\mu\text{J}$ , es wurden jeweils 25 Messreihen gemittelt (für 20 fs-Schritte 36). Aufgrund fehlender BBOT-Messungen für die photometrische Korrektur wurde diese im Bereich von  $\lambda_{Up} = 318 \text{ nm}$ -334 nm extrapoliert. Lognormalfunktionen wurden für die Kurzzeitmessung von 23500-17800  $\text{cm}^{-1}$ , für die Langzeitmessungen von 23750-17780  $\text{cm}^{-1}$  angepasst.

TCSPC-Messungen wurden mit einem *Edinburgh Instruments FLS920* auf 18 verschiedenen Emissionswellenlängen von 410-600 nm durchgeführt, wobei der Emissionsbandbreite 2.2 nm betrug. Die Anregung erfolgte wie bei den FLUPS-Messungen bei 400 nm, mit einer Bandbreite von 10 nm und einer Repetitionsrate von 5 MHz. Die Detektion erfolgte bis 50 ns auf 4096 Kanälen im magischen Winkel bis 10000 Counts im Maximum erreicht waren. Die Zeitauflösung, anhand der IRF berechnet betrug 180 ps.

## 2.8 PepQ

Für die Fluoreszenzmessung bei  $pH = 5$  wurde PepQ (aufgearbeitet unter aziden Bedingungen) in wässrigem Puffer (10 mM Natriumchlorid, 1 mM Natriumborat) gelöst. Die Absorption in einer 1 mm-Küvette bei der Anregungswellenlänge 353 nm betrug 0.84. Die Fluoreszenz wurde mit den Spaltbreiten  $X/X = 2000/1000$  und  $M/M = 1600/1600$  mit 1 s Integrationszeit pro Wellenlänge gemessen, es wurden 9 Spektren gemittelt.

Transiente Absorptionsspektren dieser Probe wurden bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm aufgenommen. Es wurden 8 Zeitspuren mit paralleler Polarisation von Pump und Probe, 16 mit perpendikularer Polarisation und 16 im magischen Winkel aufgenommen, jeweils in den Schrittweiten 20 fs (bis 6 ps), 400 fs (bis 130 ps) und 4 ps (bis 1600 ps). Die Absorption in der Zelle bei der Anregungswellenlänge betrug 470 mOD. Die Anregungs-

energie betrug  $0.4\text{ }\mu\text{J}$ . Als Referenz wurden Spektren von MQ unter gleichen Bedingungen aufgenommen.

Für die FLUPS-Messungen bei  $pH = 9$  wurde PepQ (aufgearbeitet unter basischen Bedingungen) in wässriger Pufferlösung (siehe oben) gelöst und zentrifugiert, die Absorption bei der Anregungswellenlänge ( $400\text{ nm}$ ) betrug  $1.8$ . Die Pumpenergie wurde herabgesetzt auf  $1\text{ }\mu\text{J}$ . Es wurden je 6 Messreihen in den Schrittweiten  $20\text{ fs}$  (bis  $3\text{ ps}$ )  $200\text{ fs}$  (bis  $30\text{ ps}$ ) und  $4\text{ ps}$  (bis  $700\text{ ps}$ ) im Mess-Modus Case A aufgenommen. Die Gatewellenlänge wurde zu  $1360\text{ nm}$  bestimmt. Die Detektion erfolgte perpendicular zur Anregung mit  $1.5\text{ s}$  Integrationszeit mit horizontalem Binning von 2 Pixeln. Es konnte mit der Zeit ein Gelierungsprozess beobachtet werden, sodass während jeder Messreihe das Pumpstreulicht stark anstieg. Für jede Messreihe wurde die Zelle leicht verschoben um diesen Effekt zu minimieren.

## 2.9 Aliphatisch substituierte 6-Oxychinoline

Die stationären Messungen wurden in einer  $1\text{ cm}$ -Küvette durchgeführt, wobei die Konzentrationen so eingestellt wurden, dass die Absorption in der Messküvette  $0.4$  bei  $400\text{ nm}$  beträgt. alle Lösungen wurden mit einem Spritzenvorsatzfilter filtriert (Porengröße  $200\text{ nm}$ ). Absorptionsmessungen wurden stets gegen eine Referenz-Pufferlösung gemessen, die Basislinie wurde ebenfalls gegen diese in der Messküvette mit Pufferlösung aufgenommen. Die Fluoreszenzmessungen nach Anregung bei  $400\text{ nm}$  wurden mit den Monochromatorspaltbreiten  $X/X = 2500/2000$  und  $M/M = 1600/1600$  durchgeführt, wobei die Fluoreszenz im rechten Winkel bei Integrationszeit  $1\text{ s}$  pro  $\text{nm}$  detektiert wurde. Es wurden je 9 Spektren gemittelt.

Für die Vorversuche der FLUPS-Messungen wurden gefilterte Lösungen in wässrigem Puffer (Merck,  $pH = 9$ ) hergestellt, welche in einer  $1\text{ mm}$ -Küvette eine Absorption von  $2.7$  im Maximum des  $S_1 - S_0$ -Übergangs aufwiesen. Die Messungen in Schritten von  $20\text{ fs}$  bis  $2.5\text{ ps}$  und  $200\text{ fs}$  bis  $23\text{ ps}$  durchgeführt. Es wurde für alle Messreihen ein  $100\text{ }\mu\text{m}$  star-

ker Kristall verwendet, konfiguriert auf Case B. Die Anregung erfolgte perpendicular zur Detektion bei 400 nm und mit einer Energie von 2  $\mu$ J. Die Integrationszeit pro Zeitschritt betrug 2 s; es wurden je 2 Pixel horizontal gebinnt und es wurden jeweils 20 Messreihen gemittelt.

Die Präzisions-Flussmessungen ebenfalls mit einem 100  $\mu$ m dicken Kristall durchgeführt, allerdings konfiguriert auf Case A. Die Lösungen (ebenfalls Puffer  $pH = 9$ , filtriert) wiesen in einer 1 mm-Küvette bei 400 nm eine Absorption von 2.5 auf. Es wurden die gleichen Zeitschritte gewählt, wie bei den Vorversuchen. Die Integrationszeit betrug 1.5 s pro Spektrum, welche ebenfalls mit horizontalem Binning von 2 Pixeln aufgenommen wurde. Die Anregung erfolgte bei 400 nm mit perpendicularer Polarisation zur Detektion mit einer Energie von 1  $\mu$ J pro Puls. Es wurden je 30 Messungen gemittelt.

Für die transienten Absorptionsmessungen wurden die Konzentrationen der filtrierten Lösungen in wässrigem Puffer ( $pH = 9$ ) so eingestellt, dass die Absorption in einer 1 mm-Küvette 1.3 betrug. Die Anregung erfolgte bei 400 nm mit einer Energie von 0.4  $\mu$ J pro Puls. Es wurden jeweils 8 Messungen bei paralleler Polarisation, 16 perpendicular und 8 im magischen Winkel aufgenommen jeweils in den Schrittweiten 6 fs (bis 400 fs), 20 fs (bis 8 ps) und 200 fs (bis 80 ps).

# Literaturverzeichnis

- [1] Den Sinn erhaltend zusammengesetzt aus "Dis Wasser war Matrix. [...] das ist nun Matrix der Welt". Siehe Quellen [2] und [3].
- [2] Jacobi, J., Ed. *Paracelsus: Selected Writtings*; Princeton University Press, 1979.
- [3] Weeks, A., Ed. *Paracelsus (Theophrastus Bombastus von Hohenheim, 1493-1541) Essential Theoretical Writings*; Brill: Leiden/Boston, 2008.
- [4] Nandi, N.; Bhattacharyya, K.; Bagchi, B. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2013–2046.
- [5] Ball, P. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 74–108.
- [6] Eisenberg, D.; Kauzmann, W. *The Structure and Properties of Water*; Oxford Clarendon, London, 1969.
- [7] Laage, D.; Hynes, J. T. *Science* **2006**, *311*, 832–835.
- [8] Laage, D.; Hynes, J. T. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 14230–14242.
- [9] Duboué-Dijon, E.; Fogarty, A. C.; Laage, D. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 1574–1583.
- [10] Jimenez, R.; Fleming, G. R.; Kumar, P. V.; Maroncelli, M. *Nature* **1994**, *369*, 471–473.
- [11] Zhao, L.; Pérez Lustres, J. L.; Farztdinov, V.; Ernsting, N. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 1716–1725.

- [12] Zhang, X.-X.; Würth, C.; Zhao, L.; Resch-Genger, U.; Ernsting, N. P.; Sajadi, M. *Rev. Sci. Instrum.* **2011**, *82*, 063108.
- [13] Sajadi, M.; Berndt, F.; Richter, C.; Gerecke, M.; Mahrwald, R.; Ernsting, N. P. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1845–1849.
- [14] Buchner, R.; Barthel, J.; Stauber, J. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *306*, 57 – 63.
- [15] Ebbinghaus, S.; Kim, S. J.; Heyden, M.; Yu, X.; Heugen, U.; Gruebele, M.; Leitner, D. M.; Havenith, M. *P. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 20749–20752.
- [16] Knake, L.; Schwaab, G.; Kartaschew, K.; Havenith, M. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 13842–13851.
- [17] Hunger, J.; Tielrooij, K.-J.; Buchner, R.; Bonn, M.; Bakker, H. J. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 4783–4795.
- [18] Bakshiev, N. G. *Opt. Spectrosc. (USSR)* **1964**, *16*, 446–.
- [19] Horng, M. L.; Gardecki, J. A.; Papazyan, A.; Maroncelli, M. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17311–17337.
- [20] Ruthmann, J.; Kovalenko, S. A.; Ernsting, N. P.; Ouw, D. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 5466–5468.
- [21] Pérez Lustres, J. L.; Kovalenko, S. A.; Mosquera, M.; Senyushkina, T.; Flasche, W.; Ernsting, N. P. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2005**, *44*, 5635–5639.
- [22] Sajadi, M.; Ajaj, Y.; Ioffe, I.; Weingärtner, H.; Ernsting, N. P. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2010**, *49*, 454–457.
- [23] Sajadi, M.; Weinberger, M.; Wagenknecht, H.-A.; Ernsting, N. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 17768–17774.
- [24] Maroncelli, M.; MacInnis, J.; Fleming, G. R. *Science* **1989**, *243*, 1674–1681.



- [25] Dimroth, K.; Reichardt, C.; Siepmann, T.; Bohlmann, F. *Liebigs. Ann. Chem.* **1963**, *661*, 1–37.
- [26] Perez-Lustres, J. L.; Rodriguez-Prieto, F.; Mosquera, M.; Senyushkina, T. A.; Ernsting, N. P.; Kovalenko, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5408–5418.
- [27] Allolio, C.; Sajadi, M.; Ernsting, N. P.; Sebastiani, D. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2013**, *52*, 1813–1816.
- [28] Petrone, A.; Donati, G.; Caruso, P.; Rega, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14866–14874.
- [29] Heid, E.; Harringer, S.; Schröder, C. *J. Chem. Phys.* **2016**, *145*, 164506.
- [30] Heid, E.; Schröder, C. *J. Chem. Phys.* **2016**, *145*, 164507.
- [31] Böttcher, C. J. F. *Theory of Electric Polarization*; Elsevier: Amsterdam, 1983; Vol. 1.
- [32] Hsu, C.-P.; Song, X.; Marcus, R. A. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 2546–2551.
- [33] Helge, L.; Tkachenko Nikolai, V.; Bernard, V.; Jun-ichi, H.; Marcel, A.; Ernsting, N. P.; Thomas, G.; Noël, B. *Pure Appl. Chem.* **2014**, *86*, 1969.
- [34] Lakowicz, J. R.; Szmackinski, H.; Nowaczyk, K.; Berndt, K. W.; Johnson, M. *Anal. Biochem.* **1992**, *202*, 316 – 330.
- [35] Schanz, R.; Kovalenko, S. A.; Kharlanov, V.; Ernsting, N. P. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *79*, 566–568.
- [36] Sajadi, M.; Quick, M.; Ernsting, N. P. *Appl. Phys. Lett.* **2013**, *103*, 173514.
- [37] Gerecke, M.; Bierhance, G.; Gutmann, M.; Ernsting, N. P.; Rosspeintner, A. *Rev. Sci. Instrum.* **2016**, *87*, 053115.
- [38] Zgrablic, G.; Voitchovsky, K.; Kindermann, M.; Haacke, S.; Chergui, M. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 2779 – 2788.

- [39] Cannizzo, A.; Bräm, O.; Zgrablic, G.; Tortschanoff, A.; Oskouei, A. A.; van Mourik, F.; Chergui, M. *Opt. Lett.* **2007**, *32*, 3555–3557.
- [40] Léonard, J.; Gelot, T.; Torgasin, K.; Haacke, S. *J. Phys. Conf. Ser.* **2011**, *277*, 012017.
- [41] Sung, J.; Kim, P.; Fimmel, B.; Würthner, F.; Kim, D. *Nature Commun.* **2015**, *6*, 8646.
- [42] It is known.
- [43] Valentin G. Dmitriev, D. N. N., Gagik G. Gurzadyan *Handbook of Nonlinear Optical Crystals*, 3rd ed.; Springer Series in Optical Sciences; Springer Berlin Heidelberg, 1999; Vol. 64.
- [44] Kinoshita, S.; Ozawa, H.; Kanematsu, Y.; Tanaka, I.; Sugimoto, N.; Fujiwara, S. *Rev. Sci. Instrum.* **2000**, *71*, 3317–3322.
- [45] Takeda, J.; Nakajima, K.; Kurita, S.; Tomimoto, S.; Saito, S.; Suemoto, T. *Phys. Rev. B* **2000**, *62*, 10083–10087.
- [46] Schmidt, B.; Laimgruber, S.; Zinth, W.; Gilch, P. *Applied Physics B* **2003**, *76*, 809–814.
- [47] Arzhantsev, S.; Maroncelli, M. *Appl. Spectrosc.* **2005**, *59*, 206–220.
- [48] Ernsting, N. P.; Breffke, J.; Vorobyev, D. Y.; Duncan, D. A.; Pfeffer, I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 2043–2049.
- [49] Sajadi, M.; Dobryakov, A.; Garbin, E.; Ernsting, N.; Kovalenko, S. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *489*, 44 – 47.
- [50] Fujiwara, T.; Romano, N. C.; Lim, E. C. *Opt. Commun.* **2014**, *315*, 324 – 328.
- [51] Appavoo, K.; Sfeir, M. Y. *Rev. Sci. Instrum.* **2014**, *85*, 055114.

- [52] Chen, K.; Gallaher, J. K.; Barker, A. J.; Hodgkiss, J. M. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1732–1737.
- [53] Fita, P.; Stepanenko, Y.; Radzewicz, C. *Appl. Phys. Lett.* **2005**, *86*, 021909.
- [54] Chen, H.; Weng, Y.; Zhang, J. *J. Opt. Soc. Am. B* **2009**, *26*, 1627–1634.
- [55] Du, S.; Zhang, D.; Shi, Y.; Li, Q.; Feng, B.; Han, X.; Weng, Y.; Zhang, J.-Y. *Opt. Commun.* **2009**, *282*, 1884 – 1887.
- [56] Ding, Q.; Meng, K.; Yang, H.; Wang, S.; Gong, Q. *Opt. Commun.* **2011**, *284*, 3110 – 3113.
- [57] Dang, W.; Mao, P.; Weng, Y. *Rev. Sci. Instrum.* **2013**, *84*, 073105.
- [58] Gerecke, M. Femtosekunden-Solvatationsdynamik von Phospholipiddoppelschichten. Diplomarbeit, 2013; Humboldt-Universität zu Berlin.
- [59] Bierhance, G. Solvatationsdynamik von Cyclohexylmethyl-6-oxychinolinium-betain mittels Femtosekunden-Fluoreszenz-Aufkonversions-Spektroskopie. Bachelorarbeit, 2015; Humboldt-Universität zu Berlin.
- [60] Zernicke, F.; Midwinter, J. E. *Applied Nonlinear Optics*; Wiley, New York, 1973.
- [61] Klein, R.; Kugel, G.; Maillard, A.; Sifi, A.; Polgár, K. *Optical Materials* **2003**, *22*, 163 – 169.
- [62] Miller, R. C. *Appl. Phys. Lett.* **1964**, *5*, 17–19.
- [63] Rusch, P. F.; Lelieur, J. P. *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 1541–1543.
- [64] Gardecki, J. A.; Maroncelli, M. *Appl. Spectrosc.* **1998**, *52*, 1179–1189.
- [65] Angulo, G.; Brucka, M.; Gerecke, M.; Grampp, G.; Jeannerat, D.; Milkiewicz, J.; Mitrev, Y.; Radzewicz, C.; Rosspeintner, A.; Vauthey, E.; Wnuk, P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 18460–18469.

- [66] Pancur, T.; Renth, F.; Temps, F.; Harbaum, B.; Kruger, A.; Herges, R.; Nather, C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 1985–1989.
- [67] Bahrenburg, J.; Renth, F.; Temps, F.; Plamper, F.; Richtering, W. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 11549–11554.
- [68] Quick, M.; Dobryakov, A. L.; Gerecke, M.; Richter, C.; Berndt, F.; Ioffe, I. N.; Granovsky, A. A.; Mahrwald, R.; Ernsting, N. P.; Kovalenko, S. A. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 8756–8771.
- [69] Moreno, J.; Gerecke, M.; Dobryakov, A. L.; Ioffe, I. N.; Granovsky, A. A.; Bléger, D.; Hecht, S.; Kovalenko, S. A. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 12281–12288.
- [70] Moreno, J.; Gerecke, M.; Grubert, L.; Kovalenko, S. A.; Hecht, S. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2016**, *55*, 1544–1547.
- [71] Lakowicz, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Principles of Fluorescence Spectroscopy Bd. 1; Springer, 2006.
- [72] Cannizzo, A.; van Mourik, F.; Gawelda, W.; Zgrablic, G.; Bressler, C.; Chergui, M. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2006**, *45*, 3174–3176.
- [73] Singh, C.; Ghosh, R.; Mondal, J. A.; Palit, D. K. *J. Photoch. Photobio. A* **2013**, *263*, 50 – 60.
- [74] Kovalenko, S. A.; Schanz, R.; Senyushkina, T. A.; Ernsting, N. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 703–707.
- [75] Sajadi, M.; Furse, K. E.; Zhang, X.-X.; Dehmel, L.; Kovalenko, S. A.; Corcelli, S. A.; Ernsting, N. P. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2011**, *50*, 9501–9505.
- [76] Pal, S. K.; Peon, J.; Zewail, A. H. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *363*, 57 – 63.
- [77] Hess, S.; Davis, W. B.; Voityuk, A. A.; Rösch, N.; Michel-Beyerle, M. E.; Ernsting, N. P.; Kovalenko, S. A.; Pérez Lustres, J. L. *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 452–455.

- [78] Pal, S. K.; Zhao, L.; Zewail, A. H. *P. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 8113–8118.
- [79] Pal, N.; Verma, S. D.; Sen, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9277–9279.
- [80] Verma, S. D.; Pal, N.; Singh, M. K.; Sen, S. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 2621–2626.
- [81] Verma, S. D.; Pal, N.; Singh, M. K.; Sen, S. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 11019–11029.
- [82] Brauns, E. B.; Madaras, M. L.; Coleman, R. S.; Murphy, C. J.; Berg, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11644–11649.
- [83] Brauns, E. B.; Madaras, M. L.; Coleman, R. S.; Murphy, C. J.; Berg, M. A. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88*, 158101.
- [84] Pal, S. K.; Zhao, L.; Xia, T.; Zewail, A. H. *P. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 13746–13751.
- [85] Andreatta, D.; Lustres, J. L. P.; Kovalenko, S. A.; Ernsting, N. P.; Murphy, C. J.; Coleman, R. S.; Berg, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7270–7271.
- [86] Andreatta, D.; Sen, S.; Lustres, J. L. P.; Kovalenko, S. A.; Ernsting, N. P.; Coleman, C. J. M. R. S.; Berg, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6885–6892.
- [87] Dallmann, A.; Pfaffe, M.; Mügge, C.; Mahrwald, R.; Kovalenko, S. A.; Ernsting, N. P. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15619–15628.
- [88] Dehmel, L.; Berndt, F.; Weinberger, M.; Sajadi, M.; Ioffe, I.; Wagenknecht, H.-A.; Ernsting, N. P. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 6813–6820.
- [89] Merkel, M.; Dehmel, L.; Ernsting, N. P.; Wagenknecht, H.-A. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2017**, *56*, 384–388.
- [90] Dwyer, J. R.; Szyc, u.; Nibbering, E. T. J.; Elsaesser, T. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 11194–11197.

- [91] Łukasz Szyc.; Dwyer, J. R.; Nibbering, E. T.; Elsaesser, T. *Chem. Phys.* **2009**, *357*, 36 – 44.
- [92] Szyc, L.; Yang, M.; Nibbering, E. T. J.; Elsaesser, T. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2010**, *49*, 3598–3610.
- [93] Siebert, T.; Guchhait, B.; Liu, Y.; Costard, R.; Elsaesser, T. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 9670–9677.
- [94] Sen, S.; Andreatta, D.; Ponomarev, S. Y.; Beveridge, D. L.; Berg, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1724–1735.
- [95] Sajadi, M.; Oberhuber, T.; Kovalenko, S. A.; Mosquera, M.; Dick, B.; Ernsting, N. P. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 44–55.
- [96] Maciejewski, A.; Krystkowiak, E.; Koput, J.; Dobek, K. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 322–332.
- [97] Furse, K. E.; Corcelli, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13103–13109.
- [98] Floisand, D. J.; Corcelli, S. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 4012–4017.
- [99] Dehmel, L. NMR solution structure of DNA double helices with built-in polarity probes. Dissertation, 2015; Humboldt-Universität zu Berlin.
- [100] Hövelmann, F. Synthese und Charakterisierung einfach und mehrfach internmarkierter DNA-Sonden zur erzwungenen Interkalation: Hybridisierungssonden für biologische Anwendungen. Dissertation, 2015; Humboldt-Universität zu Berlin.
- [101] Voet, D.; Voet, J.; Pratt, C.; Beck-Sickinger, A.; Hahn, U. *Lehrbuch der Biochemie*; Wiley VCH Verlag GmbH, 2010.
- [102] Gawrisch, K.; Gaede, H.; Mihailescu, M.; White, S. *Eur. Biophys. J.* **2007**, *36*, 281–291.
- [103] Cheng, J.-X.; Pautot, S.; Weitz, D. A.; Xie, X. S. *P. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 9826–9830.

- [104] Pasenkiewicz-Gierula, M.; Takaoka, Y.; Miyagawa, H.; Kitamura, K.; Kusumi, A. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 3677–3691.
- [105] Pal, S. K.; Sukul, D.; Mandal, D.; Bhattacharyya, K. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 4529–4531.
- [106] Pal, S. K.; Sukul, D.; Mandal, D.; Sen, S.; Bhattacharyya, K. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6999–7002.
- [107] Datta, A.; Pal, S. K.; Mandal, D.; Bhattacharyya, K. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 6114–6117.
- [108] Viard, M.; Gallay, J.; Vincent, M.; Meyer, O.; Robert, B.; Paternostre, M. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2221–2234.
- [109] Sýkora, J.; Kapusta, P.; Fidler, V.; Hof, M. *Langmuir* **2002**, *18*, 571–574.
- [110] Seidel, M.; Jethwa, J.; Vöhringer, P. *Russ. Chem. B+* **2004**, *53*, 1471–1476.
- [111] Barucha-Kraszewska, J.; Kraszewski, S.; Jurkiewicz, P.; Ramseyer, C.; Hof, M. *BBA - Biomembranes* **2010**, *1798*, 1724 – 1734.
- [112] Bürsing, H.; Ou, D.; Kundu, S.; Vöhringer, P. *Phys. Chem. Chem. Phys* **2001**, *3*, 2378–2387.
- [113] Bürsing, H., H.sing; Kundu, S.; Vöhringer, P. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 2404–2414.
- [114] Lu, W.; Kim, J.; Qiu, W.; Zhong, D. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *388*, 120–126.
- [115] MacDonald, R. C.; MacDonald, R. I.; Menco, B. P.; Takeshita, K.; Subbarao, N. K.; rong Hu, L. *BBA - Biomembranes* **1991**, *1061*, 297–303.
- [116] Klymchenko, A. S.; Duportail, G.; Demchenko, A. P.; Mély, Y. *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2929–2941.

- [117] Pal, S. K.; Peon, J.; Bagchi, B.; Zewail, A. H. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 12376–12395.
- [118] Halle, B. *Philos. T. Roy. Soc. B* **2004**, *359*, 1207–1224.
- [119] Zhong, D.; Pal, S. K.; Zewail, A. H. *Chem. Phys. Lett.* **2011**, *503*, 1 – 11.
- [120] Zhang, L.; Wang, L.; Kao, Y.-T.; Qiu, W.; Yang, Y.; Okobiah, O.; Zhong, D. *P. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 18461–18466.
- [121] Qiu, W.; Kao, Y.-T.; Zhang, L.; Yang, Y.; Wang, L.; Stites, W. E.; Zhong, D.; Zewail, A. H. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13979–13984.
- [122] Li, T.; Hassanali, A. A.; Kao, Y.-T.; Zhong, D.; Singer, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3376–3382.
- [123] Modig, K.; Liepinsh, E.; Otting, G.; Halle, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 102–114.
- [124] Mattea, C.; Qvist, J.; Halle, B. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 2951–2963.
- [125] Born, B.; Kim, S. J.; Ebbinghaus, S.; Gruebele, M.; Havenith, M. *Faraday Discuss.* **2009**, *141*, 161–173.
- [126] Xu, Y.; Bäumer, A.; Meister, K.; Bischak, C. G.; DeVries, A. L.; Leitner, D. M.; Havenith, M. *Chem. Phys. Lett.* **2016**, *647*, 1 – 6.
- [127] King, J. T.; Arthur, E. J.; Brooks, C. L.; Kubarych, K. J. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 5604–5611.
- [128] Mazur, K.; Heisler, I. A.; Meech, S. R. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 2678–2685.
- [129] Knapp, E. W.; Muegge, I. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11339–11343.
- [130] Muegge, I.; Knapp, E. W. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1371–1374.
- [131] Sterpone, F.; Stirnemann, G.; Laage, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4116–4119.



- [132] Fogarty, A. C.; Duboue-Dijon, E.; Sterpone, F.; Hynes, J. T.; Laage, D. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5672–5683.
- [133] Rahaman, O.; Melchionna, S.; Laage, D.; Sterpone, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 10.1039/C3CP44582H.
- [134] Fogarty, A. C.; Laage, D. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 7715–7729.
- [135] Bryant, R. G. *CR Phys.* **2010**, *11*, 128 – 135.
- [136] Marqusee, S.; Baldwin, R. L. *P. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 8898–8902.
- [137] Dzubiella, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14000–14007.
- [138] Mason, S. F.; Philp, J.; Smith, B. E. *J. Chem. Soc. A* **1968**, 3051–3056.
- [139] Schulman, S.; Fernando, Q. *Tetrahedron* **1968**, *24*, 1777 – 1783.
- [140] Bardez, E.; Chatelain, A.; Larrey, B.; Valeur, B. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 2357–2366.
- [141] Bekcioglu, G.; Hoffmann, F.; Sebastiani, D. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 9244–9251.
- [142] Kovalenko, S. A.; Dobryakov, A. L.; Ruthmann, J.; Ernsting, N. P. *Phys. Rev. A* **1999**, *59*, 2369–2384.
- [143] Dobryakov, A. L.; Kovalenko, S. A.; Weigel, A.; Perez-Lustres, J. L.; Lange, J.; Müller, A.; Ernsting, N. P. *Rev. Sci. Instrum.* **2010**, *81*, 113106.
- [144] Kovalenko, S.; Ruthmann, J.; Ernsting, N. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *271*, 40 – 50.
- [145] Karunakaran, V.; Pfaffe, M.; Ioffe, I.; Senyushkina, T.; Kovalenko, S. A.; Mahrwald, R.; Fartzdinov, V.; Sklenar, H.; Ernsting, N. P. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 4294–4307.
- [146] Schulz, J. C. F.; Rinne, K. F.; Gerecke, M.; Ernsting, N. P.; Netz, R. Unpublished.
- [147] Rinne, K. F.; Schulz, J. C. F.; Netz, R. R. *J. Chem. Phys.* **2015**, *142*, 215104.

- [148] Gerecke, M.; Richter, C.; Quick, M.; Ioffe, I. N.; Mahrwald, R.; Kovalenko, S. A.; Ernsting, N. P. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121*, 9631–9638.
- [149] Soper, A. K.; Finney, J. L. *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *71*, 4346–4349.
- [150] Haselmeier, R.; Holz, M.; Marbach, W.; Weingaertner, H. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 2243–2246.
- [151] Rezus, Y. L. A.; Bakker, H. J. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99*, 148301.
- [152] Rezus, Y. L. A.; Bakker, H. J. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 2355–2361.
- [153] Rezus, Y. L. A.; Bakker, H. J. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 4038–4044.
- [154] Petersen, C.; Tielrooij, K.-J.; Bakker, H. J. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 214511.
- [155] Bakulin, A. A.; Pshenichnikov, M. S.; Bakker, H. J.; Petersen, C. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 1821–1829.
- [156] Laage, D.; Stirnemann, G.; Hynes, J. T. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 2428–2435.
- [157] Stirnemann, G.; Hynes, J. T.; Laage, D. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 3052–3059.
- [158] Laage, D.; Stirnemann, G.; Sterpone, F.; Hynes, J. T. *Accounts Chem. Res.* **2012**, *45*, 53–62.
- [159] Duboué-Dijon, E.; Laage, D. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 8406–8418.
- [160] Titantah, J. T.; Karttunen, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9362–9368.
- [161] Galamba, N. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 2153–2159.
- [162] Galamba, N. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4169–4176.
- [163] Rossato, L.; Rossetto, F.; Silvestrelli, P. L. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 4552–4560.
- [164] Graziano, G. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 2598–2599.
- [165] Kim, J.; Tian, Y.; Wu, J. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 12108–12116.

- [166] Frank, H. S.; Evans, M. W. *J. Chem. Phys.* **1945**, *13*, 507–532.
- [167] Qvist, J.; Halle, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10345–10353.
- [168] Mazur, K.; Heisler, I. A.; Meech, S. R. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 2563–2573.
- [169] Comez, L.; Lupi, L.; Paolantoni, M.; Picchiò, F.; Fioretto, D. *J. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 114509.
- [170] Shiraga, K.; Suzuki, T.; Kondo, N.; Ogawa, Y. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 235103.
- [171] Banik, D.; Roy, A.; Kundu, N.; Sarkar, N. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 9905–9919.
- [172] Zemánková, K.; Troncoso, J.; Cerdeirina, C. A.; Romani, L. *Chem. Phys. Lett.* **2015**, *640*, 184 – 187.
- [173] Zemánková, K.; Troncoso, J.; Cerdeirina, C. A.; Romani, L.; Anisimov, M. A. *Chem. Phys.* **2016**, *472*, 36 – 43.
- [174] Davis, J. G.; Gierszal, K. P.; Wang, P.; Ben-Amotz, D. *Nature* **2012**, *491*, 582–585.
- [175] Liu, L.; Strazdaite, S.; Bakker, H. J. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 27363–27369.
- [176] Gupta, R.; Patey, G. N. *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 064502.
- [177] Chapman, C. F.; Fee, R. S.; Maroncelli, M. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 4811–4819.
- [178] Gustavsson, T.; Cassara, L.; Gurzadyan, V. G. G.; Mialocq, J.-C.; Pommeret, S.; Sorgius, M.; van der Meulen, P. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 4229–4245.
- [179] Kumar, P. V.; Maroncelli, M. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 3038–3060.
- [180] Kumpulainen, T.; Rosspeintner, A.; Vauthey, E. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 8815–8825.
- [181] Song, X.; Chandler, D. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 2594–2600.
- [182] Varilly, P.; Patel, A. J.; Chandler, D. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 074109.

- [183] Kovalenko, A. *Cond. Matt. Phys.* **2015**, *18*, 32601.
- [184] Weiß, R. G.; Heyden, M.; Dzubiella, J. *Phys. Rev. Lett.* **2015**, *114*, 187802.
- [185] Heid, E.; Schröder, C. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121*, 9639–9646.

## Eigene Publikationen

Quick, M.; Dobryakov, A. L.; **Gerecke, M.**; Richter, C.; Berndt, F.; Ioffe, I. N.; Granovsky, A. A.; Mahrwald, R.; Ernsting, N. P. Photoisomerization Dynamics and Pathways of trans- and cis-Azobenzene in Solution from Broadband Femtosecond Spectroscopies and Calculations. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 8756–8771.

Sajadi, M.; Berndt, F.; Richter, C.; **Gerecke, M.**; Mahrwald, R.; Ernsting, N. P. Observing the Hydration Layer of Trehalose with a Linked Molecular Terahertz Probe. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 1845–1849.

Moreno, J.; **Gerecke, M.**; Dobryakov, A. L.; Ioffe, I. N.; Granovsky, A. A.; Bléger, D.; Hecht, S.; Kovalenko, S. A. Two-Photon-Induced versus One-Photon-Induced Isomerization Dynamics of a Bistable Azobenzene Derivative in Solution. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 12281–12288.

Moreno, J.; **Gerecke, M.**, Grubert, L.; Kovalenko, S. A.; Hecht, S. Sensitized Two-NIR-Photon Z→E Isomerization of an All-Visible and Bistable Azobenzene Derivative. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1544–1547.

**Gerecke, M.**, Bierhance, G.; Gutmann, M.; Ernsting, N. P.; Rosspeintner, A. Femtosecond broadband fluorescence upconversion spectroscopy: spectral coverage versus efficiency. *Rev. Sci. Instrum.* **2016**, *87*, 053115.

Gonzalo, A.; Brucka, M.; **Gerecke, M.**; Grampp, G.; Jeannerat, D.; Milkiewicz, J.; Mitrev, Y.; Radzewicz, C.; Rosspeintner, A.; Vauthey, E.; Wnuk, P. Characterization of dimethylsulfoxide / glycerol mixtures: A binary solvent system for the study of „friction-dependent“ chemical reactivity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 18460-18469.

Zahn, C.; Stensitzki, T.; **Gerecke, M.**; Berg, A.; Mahammed, A.; Gross, Z.; Heyne, K. Ultrafast Dynamics of Sb-Corroles: A Combined Vis-Pump Supercontinuum Probe and Broadband Fluorescence Up-Conversion Study. *Molecules* **2017**, *22*, 1174.

**Gerecke, M.**; Richter, C.; Quick, M.; Ioffe, I. N.; Mahrwald, R.; Kovalenko, S. A.; Ernsting, N. P. Effect of a tertiary butyl group on polar solvation dynamics in aqueous solution: Femtosecond fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 9631-9638.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>A1</b>	Azobenzenderivat 1, Struktur in Abb. 2.11
<b>A2</b>	Azobenzenderivat 2, Struktur in Abb. 2.11
<b>3Ada-MQ</b>	MQ, H an Position 3 substituiert mit Adamantylgruppe
<b>2AP</b>	2-Aminopurin
<b>4AP</b>	4-Aminophthalimid
<b>BL</b>	Grundzustandsausbleichen
<b>BBO</b>	$\beta$ -Bariumborat
<b>BBOT</b>	Thiophen-Standardfarbstoff
<b>C153</b>	Cumarin 153, Standardfarbstoff
<b>C18Q</b>	6-Oxy-1-stearylchinolinium Betain
<b>C6H</b>	Cumarin 6H, Standardfarbstoff
<b>CCD</b>	Ladungsgekoppeltes Bauteil, Sensor
<b>DANS</b>	<i>E</i> -4-Dimethylamino-4'-nitrostilben
<b>DAP</b>	2,4-Diaminopyrimidin
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DCM</b>	Pyran-Standardfarbstoff
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EtQ</b>	MQ, <i>N</i> -Methylgruppe durch Ethylgruppe substituiert
<b>2Et-MQ</b>	MQ, H an Position 2 substituiert mit Ethylgruppe
<b>3Et-MQ</b>	MQ, H an Position 3 substituiert mit Ethylgruppe

<b>ESA</b>	Absorption angeregter Zustände
<b>H33258</b>	Hoechst-Farbstoff 33289
<b>HNF</b>	2-Hydroxy-7-nitrofluoren
<b>HOMO</b>	Höchstes besetztes Molekülorbital
<b>HQ</b>	Protonierter Chromophor 6-Hydroxychinolinium
<b>iPrQ</b>	MQ, <i>N</i> -Methylgruppe durch <i>iso</i> -Propylgruppe substituiert
<b>IR</b>	Infrarot
<b>IRF</b>	Gerätefunktion
<b>FLUPS</b>	Fluoreszenz-Aufkonversions Spektrometer
<b>FNOPAS</b>	Fluoreszenz verstärkt in einem NOPA
<b>LUMO</b>	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
<b>2Me-MQ</b>	MQ, an Position 2 substituiert mit Methylgruppe
<b>3Me-MQ</b>	MQ, an Position 3 substituiert mit Methylgruppe
<b>13mer6HQ</b>	13mer DNA-Doppelstrang mit Chromophor Q
<b>MD</b>	Molekulardynamik
<b>MQ</b>	N-Methyl-6-oxychinolinium Betain
<b>NMR</b>	Kernspinresonanzspektroskopie
<b>NOPA</b>	Nicht-collinear optisch parametrischer Verstärker
<b>NOE</b>	Kern-Overhauser-Effekt
<b>OKE</b>	Optischer Kerr-Effekt
<b>Pep</b>	Polypeptid Ac-AEAAAKEAAAKEAAKA-NH <sub>2</sub>
<b>PepQ</b>	Pep verlängert um einen Glycinspacer und ein Cystein, markiert mit Q
<b>POPC</b>	1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin
<b>PT</b>	Protonentransfer
<b>Q</b>	Deprotonierter Chromophor 6-Oxychinolinium Betain



---

<b>RDC</b>	Dipolare Restkopplung in NMR
<b>RMSD</b>	Quadratisches Mittel der Fitresiduen
<b>SE</b>	Stimulierte Emission
<b>SFG</b>	Summenfrequenzerzeugung
<b>SHG</b>	Frequenzverdopplung
<b>SPC/E</b>	Spezielles Modell für Wasser
<b>SVD</b>	Singularwert-Dekomposition
<b>3tBu-MQ</b>	MQ, an Position 3 substituiert mit <i>tert</i> -Butylgruppe
<b>TCSPC</b>	Zeitkorreliertes Einzelphotonen Zählen
<b>TDDFT</b>	Zeitaufgelöste Dichtefunktionaltheorie
<b>TDSS</b>	Zeitabhängiger Stokes-Shift
<b>TA</b>	Transiente Absorption
<b>TMAO</b>	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid
<b>TMU</b>	Tetremethylharnstoff
<b>TOPAS</b>	Optisch parametrischer Verstärker



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während der Zeit meiner Promotion unterstützt haben.

Als erstes danke ich Prof. Nikolaus Ernsting sowohl für die Überlassung des Themas, als auch für die Betreuung sowie Unterstützung dieser Arbeit und alles was er mir in den letzten 6 Jahren beigebracht hat.

Großer Dank gilt den (teilweise ehemaligen) Mitgliedern des Arbeitskreises.

Dr. Sergey Kovalenko, Dr. Alexander Dobryakov und Dr. Martin Quick danke ich für Unterstützungen auf dem Gebiet der transienten Absorption, sowie interessante Diskussionen, nicht nur die Wissenschaft betreffend.

Dr. Mohsen Sajadi Hezaveh, Dr. Xin-Xing Zhang und noch einmal Dr. Martin Quick möchte ich für die Einarbeitung mit dem FLUPS-Setup danken.

Für die Synthese aller Chinolinium-Farbstoffe danke Dr. Celin Richter und Prof. Rainer Mahrwald.

Dr. Ilya Ioffe danke ich für zahlreiche theoretische Berechnungen.

Dr. Lars Dehmel danke ich für die Einführung in das Thema der Nukleinsäuren und fortwährende IT-Hilfe.

Bei Dr. Horst Hennig und Dr. André Dallmann bedanke ich mich für interessante Diskussionen vor allem zum Thema Lehre.

Und natürlich Heiderose Steingräber und Sabrina Dabrowski, den guten Seelen des Arbeitskreises: Danke!

Ich möchte auch meinen Bachelor-Studenten beziehungsweise Praktikanten Genaro Bierhance, Martin Paul und Michael Quick für die gute Zu- und Zusammenarbeit danken.

Für hochwertige Handarbeit danke ich den Mitarbeitern der Feinmechanik- und Elektronikwerkstatt des Instituts für Chemie und Hans Scholz von der Elektronikwerkstatt des Instituts für Physik der Humboldt-Universität zu Berlin.

Weiterhin möchte ich meinen Kooperationspartnern danken: Den Arbeitsgruppen Prof. Netz und Prof. Heyne von der Freien Universität Berlin, Esther Heid und Prof. Christian Schröder von der Universität Wien, Dr. Jutta Pauli von der Bundesanstalt für Materialprüfung, Dr. Javier Moreno und Prof. Stefan Hecht vom Institut für Chemie der HU und besonders Dr. Arnulf Rosspeintner von der Université de Genève.

Für die finanzielle Unterstützung und eine interessante Graduiertenschule danke ich dem Sonderforschungsbereich 1078 „Protonation Dynamics in Protein Function“.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich für den Halt und die Unterstützung meiner Freunde, meiner Familie und meiner Lebensgefährtin.

# **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 16.05.2017

Mario Gerecke